

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA PENIČ

MAGISTRSKA NALOGA
FAKULTETA ZA FARMACIJO

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA PENIČ

**IZRAŽANJE GENOV ZA ANTIOKSIDATIVNE ENCIME V VZORCIH
SUBHONDRALE KOSTNINE
GENES EXPRESSION OF ANTIOXIDATIVE ENZYMES IN THE SAMPLES OF
SUBCHONDRAL BONE**

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom asist. dr. Janje Zupan, mag. farm. Vzorce subhondralne kostnine so zbrali na Inštitut za sodno medicino, Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani, izolacijo in vrednotenje RNA so izvedli na Katedri za klinično biokemijo, Fakultete za farmacijo, Univerze v Ljubljani, mikroarhitektura subhondralne kostnine je bila določena z metodo mikroročunalniške tomografije na Inštitutu za genetiko in molekularno medicino (IGMM), Univerze v Edinburgu.

Zahvalila bi se svoji mentorici prof. dr. Janji Marc, mag. farm., spec. med. biokem., da mi je zaupala in omogočila opravljanje magistrske naloge. Še posebej bi se zahvalila somentorici asist. dr. Janji Zupan, mag. farm., ki mi je pomagala pri eksperimentalnem delu in pri težavah, ki so nastale tekom izdelave magistrske naloge. Hvala tudi za vse spodbudne besede in nasvete.

Največje zasluge pa gredo staršem, ki sta mi omogočila študij in me vse skozi pri tem tudi podpirala, in seveda tudi Urušu, ki mi je pri pisanju stal ob strani.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem.

Anja Penič

Predsednik komisije: prof. dr. Janko Kos

Član komisije: doc. dr. Jožko Cesar

KAZALO VSEBINE

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| POVZETEK | I |
| SEZNAM OKRAJŠAV | IV |
| SEZNAM SLIK | VI |
| SEZNAM PREGLEDNIC | VII |
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. ZGRADBA SKLEPA | 1 |
| 1.1.1. KOSTNA REMODELACIJA | 2 |
| 1.1.2. RANKL/ RANK/ OPG IN URAVNAVANJE KOSTNE RAZGRADNJE | 3 |
| 1.2. OSTEOARTROZA | 3 |
| 1.2.1. PATOGENETSKI MEHANIZMI PRI OSTEOARTROZI | 4 |
| 1.2.2. SUBHONDRALNA KOSTNINA PRI OSTEOARTROZI | 5 |
| 1.2.3. RANKL/RANK/OPG IN VEGF-A PRI OA | 6 |
| 1.2.4. VPLIV OKSIDATIVNEGA STRESA IN PROSTIH RADIKALOV NA SUBHONDRALNO KOST PRI OSTEOARTROZI | 7 |
| 1.3. OBRAMBA PRED OKSIDATIVNIM STRESOM | 8 |
| 1.3.1. ANTIOKSIDATIVNI ENCIMI | 8 |
| 2. NAMEN DELA | 14 |
| 3. MATERIALI IN METODE | 15 |
| 3.1. VZORCI | 15 |
| 3.2. IZOLACIJA IN VREDNOTENJE RNA | 15 |
| 3.3. PREPIS RNA V cDNA | 16 |
| 3.4. KVANTITATIVNA VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU (qPCR) | 16 |
| 3.4.1. MATERIALI IN APARATURE | 16 |

| | | |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.4.2. | RAZVOJ METODE ZA OPTIMIZACIJO KONCENTRACIJE OLIGONUKLEOTIDNIH ZAČETNIKOV ... | 20 |
| 3.4.3. | RAZVOJ METODE ZA DOLOČEVANJE REFERENČNEGA GENA..... | 23 |
| 3.4.4. | RAZVOJ METODE ZA DOLOČEVANJE IZRAŽANJA PREISKOVANIH GENOV | 25 |
| 3.5. | STATISTIČNE METODE | 27 |
| 4. | REZULTATI..... | 29 |
| 4.1. | NAČRTOVANJE OLIGONUKLEOTIDNIH ZAČETNIKOV | 29 |
| 4.2. | ANALIZA REZULTATOV qPCR | 30 |
| 4.2.1. | OPTIMIZACIJA KONCENTRACIJE OLIGONUKLEOTIDNIH ZAČETNIKOV | 31 |
| 4.2.2. | DOLOČITEV REFERENČNIH GENOV | 36 |
| 4.2.3. | DOLOČANJE IZRAŽANJA PREISKOVANIH GENOV | 37 |
| 4.3. | STATISTIČNA ANALIZA..... | 37 |
| 4.3.1. | PREISKOVANA SKUPINA | 37 |
| 4.3.2. | IZRAŽANJE GENOV ZA RANK, RANKL IN OPG..... | 38 |
| 4.3.3. | KORELACIJA ANTIOKSIDATIVNIH ENCIMOV Z RANKL..... | 39 |
| 4.3.4. | KORELACIJA ANTIOKSIDATIVNIH ENCIMOV Z OPG | 40 |
| 4.3.5. | KORELACIJA ANTIOKSIDATIVNIH ENCIMOV Z RANK | 41 |
| 5. | RAZPRAVA | 45 |
| 5.1. | PREISKOVANA SKUPINA..... | 45 |
| 5.2. | IZRAŽANJE GENOV ZA RANK, RANKL IN OPG V SUBHONDRAJNI KOSTNINI PRI OSTEOARTROZI.. | 45 |
| 5.3. | POVEZANOST MED IZRAŽANJEM GENOV ZA VEGF-A IN OPG Z RANKL | 45 |
| 5.4. | POVEZANOST MED IZRAŽANJEM GENOV ZA TXNRD1 IN VEGF-A Z OPG | 47 |
| 5.5. | POVEZANOST IZRAŽANJE MED SOD2, TXNRD1, CAT IN SEPP1 Z RANK | 48 |
| 6. | SKLEP | 51 |
| 7. | LITERATURA | 53 |
| 8. | PRILOGE..... | 60 |

POVZETEK

Oksidativni stres povzroči povečano nastajanje reaktivnih kisikovih snovi, ki jih uravnavajo antioksidativni encimi. Predvideva se, da je porušeno ravnovesje med antioksidativnimi encimi in prostimi kisikovimi radikali eden iz med dejavnikov, ki lahko vplivajo na proces kostne remodelacije. Znano je, da je v patogenezo osteoartroze pomembno vpletena subhondralna kostnina. Pri uravnavanju kostne remodelacije v subhondralni kosti ima pomembno vlogo signalna pot RANKL/RANK/OPG, ki je odgovorna za diferenciacijo osteoklastnih predhodnikov v osteoklaste ter aktivacijo zrelih osteoklastov oziroma za osteoklastogenezo in kostno razgradnjo. Zdi se, da ima pomembno vlogo pri razvoju osteoartroze tudi proces angiogeneze. Žilni endotelijski dejavnik A (VEGF-A), ki spodbuja proces angiogeneze, pospeši izražanje gena za RANKL. Predhodne študije nakazujejo vpliv oksidativnega stresa na proces kostne razgradnje in na kvaliteto subhondralne kosti, ki pri razvoju osteoartroze postane zadebeljena in toga. V naši raziskavi smo skušali ugotoviti povezavo med izražanjem genov za antioksidativne encime in VEGF ter geni signalne poti RANK/RANKL/OPG. Povezava bi nakazovala na vpliv oksidativnega stresa na proces kostne razgradnje, vaskularizacije kostnine ter posledično s tem na kvaliteto subhondralne kosti. Uporabili smo vzorce subhondralne kostnine 21 preiskovancev brez znanih bolezni kosti ali sklepov. Izmerili smo izražanje genov osi RANK/RANKL/OPG in 7 genov, ki kodirajo antioksidativne encime, kot so superoksid dismutaza (SOD2), selenoprotein P (SEPP1), aldehyd oksidaza (AOX1), glutation-S-transferaza P1 (GSTP1), peroksiredoksin-5 (PRDX5), katalaza (CAT), tioredoksin reduktaza 1 (TXNRD1) in označevalec angiogeneze VEGF-A ter predhodno izbrali dva referenčna gena. S korelacijsko analizo smo ugotovili statistično značilno povezavo med RANKL in VEGF-A ($r = 0,867$, $p < 0,001$), ki kaže na pomembno povezanost med procesom angiogeneze in kostno remodelacijo v subhondralni kosti. Prav tako je izražanje gena za RANKL koreliralo z izražanjem genov za SOD2 ($r = -0,548$, $p = 0,010$), CAT ($r = -0,565$, $p = 0,008$) in SEPP1 ($r = 0,808$, $p < 0,001$), kar nakazuje pomembno vlogo antioksidativnih encimov pri aktivnosti osteoklastov. Na podlagi teh statistično značilnih povezav lahko zaključimo, da verjetno obstajajo tudi biološke povezave med delovanjem antioksidativnih encimov in VEGF-A ter RANK/RANKL/OPG v subhondralni kosti. Na osnovi teh povezav bi lahko

sklepali, da zvečano izražanje SOD2 in CAT zavira izražanje RANK na osteoklastih in s tem inhibira osteoklastogenezo. SEPP1 pa deluje obratno, torej spodbuja osteoklastogenezo in proces kostne razgradnje. Naši rezultati nakazujejo vpliv oksidativnega stresa na remodelacijo subhondralne kostnine. Za neposreden dokaz te statistično značilne poveze, pa bi bili potrebni nadaljnji *in vitro* poskusi na celičnih linijah.

Ključne besede: osteoartrza, antioksidativni encimi, oksidativni stres, subhondralna kost, RANK/RANKL/OPG.

ABSTRACT

Oxidative stress induces overproduction of free oxygen radicals, which are regulated by antioxidant enzymes. It is assumed that the imbalance between antioxidant enzymes and free oxygen radicals is one of the factors that may affect the process of bone remodelling. The subchondral bone is significantly involved in the pathogenesis of osteoarthritis. The regulation of bone remodelling in the subchondral bone plays an important role the RANKL/RANK/OPG signalling pathway, which is responsible for the differentiation of osteoclast precursors into osteoclasts and the activation of mature osteoclasts or osteoclastogenesis and bone loss. It seems that also the process of angiogenesis has an important role in the development of osteoarthritis. The vascular endothelial factor A (VEGF-A), which stimulates the process of angiogenesis, enhances RANKL gene expression. Preliminary studies show the effect oxidative stress has on the process of bone decomposition and the quality of the subchondral bone, which during the process of osteoarthritis thickens and rigidifies. In our study, we tried to find out whether there is an association between gene expression of the antioxidant enzymes, VEGF and genes of RANK/RANKL/OPG signal pathway. The association would point to the effect of the oxidative stress on the process of bone degradation and on the subchondral bone quality. We used subchondral bone samples of 21 examinees with no known bone or joint diseases. We measured gene expression of the RANK/RANKL/OPG axis and of 7 genes, which encode antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD2), selenoprotein P (SEPP1), aldehyde oxidase (AOX1), glutathione-S-transferase P1 (GSTP1), peroxiredoxin-5 (PRDX5), catalase (CAT), thioredoxin reductase 1 (TXNRD1), the angiogenesis marker VEGF-A and the previously selected two reference gene. With the correlation analysis we

discovered a statistically significant correlation between RANKL and VEGF-A ($r = 0,867$, $p < 0,001$), which points to the important mutual connection between the angiogenic process and subchondral bone remodelling. Also the gene expression of RANKL correlated with the gene expression of SOD2 ($r = -0,548$, $p = 0,010$), CAT ($r = -0,565$, $p = 0,008$) and SEPP1 ($r = 0,808$, $p < 0,001$), which shows the importance of antioxidant enzymes in osteoclastic activity. Based on these statistical correlations, it can be assumed that there are probably also biological connections between the antioxidant enzymes function and VEGF-A, and RANK/RANKL/OPG in the subchondral bone. On the basis of these correlations, we could assume that an increased SOD2 and CAT expression slows the expression of RANK on osteoclasts and thereby inhibits osteoclastogenesis. SEPP1, on the other hand, works just the other way round; it stimulates osteoclastogenesis and the bone decomposition process. For the direct proof of the statistically characteristic correlation, further experiments *in vitro* on bone cell lines are needed.

Keywords: osteoarthritis, antioxidant enzymes, oxidative stress, subchondral bone, RANK/RANKL/OPG.

SEZNAM OKRAJŠAV

(NF)-k B – jedrni transkripcijski dejavnik
18 rRNA – 18s podenota ribosomske ribonukleinske kisline
A – absorbanca
AOX – aldehyd oksidaza
CAT – katalaza
cDNA – komplementarna deoksiribonukleinska kislina
Cp – točka prehoda (ang. crossing point)
CYP450 – citokrom oksidaza P450
dNTP – deoksinukleozid-trifosfat
EC SOD – zunajcelična superoksid-dismutaza
ECM – ekstracelularni matriks
F-začetnik – smerni oligonukleotidni začetnik (angl. forward primer)
gDNA – genomska deoksiribonukleinska kislina
GPX – glutation peroksidaza
GSTP1 – glutation-S-transferaza P1
H⁺-ATPaza – protonska črpalka oz. adenzin-5'-trifosfataza
IGF – inzulinu podoben rastni dejavnik (angl. insulin like growth factor)
iNOS – inducibilna dušikov oksid sintaza
ITM – indeks telesne mase
MKG – mineralna kostna gostota
MMP – matriksna metaloproteinaza-9
NTC – slepa kontrola (angl. no template control)
OA – osteoartroza
OPG – osteoprotegrin
PGE2 - endogeni prostaglandin E2
PRDX5 – peroksiredoksin 5
RA – revmatoidni artritis
RANK – receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika κB
RANKL - ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κB
RNaza – ribonukleaza
ROS – reaktivne kisikove spojine
RT – reverzna transkriptaza

R-začetnik – protismerni oligonukleotidni začetnik (angl. reverse primer)

SB – subhondralna kostnina

SB29-RT – vzorec subhondralne kostnine, ki ne vsebuje encima reverzne transkriptaze

SEPP – selenoprotein P

SOD – superoksid-dismutaza

st – standard

TGF – transformirajoči rastni dejavnik (angl. transforming growth factor)

T_m – talilna temperatura

TNAP – tkivno nespecifična alkalna fosfataza

TNFR – receptor za dejavnike tumorske nekroze (angl. tumor necrosis factor receptor)

TRAIL – ligand za z apoptozo spodbujenega dejavnika tumorske nekroze (angl. TNF-related apoptosis-inducing ligand)

TRAP – tartrat rezistentna kislina fosfataza (angl. tartrate-resistant acid phosphatase)

TXN – tioredoksin

TXNRD – tioredoksin reduktaza

UDG – uracil-DNA-glikozilaza

uPA – aktivator plazminogena urokinaznega tipa

VEGF-A – žilni endotelijski rastni dejavnik A

SEZNAM SLIK

Slika 1: Zgradba sklepa pri zdravem človeku.

Slika 2: Delovanje osi RANKL/RANK/OPG na kostne celice (mRANKL = membranska oblika RANKL, sRANKL = topna oblika RANKL).

Slika 3: Histološki pregled zdravega in osteoartroznega hrustanca.

Slika 4: Detekcija produktov qPCR s SYBR Green I.

Slika 5: Shema prikazuje pipetiranje na ploščico s 384 vdolbinami pri optimizaciji koncentracije oligonukleotidnih začetnikov (shema prikazuje le del ploščice 384).

Slika 6: Shema pipetiranja na ploščico s 384 vdolbinami za določitev referenčnega gena (prikazan je le del ploščice).

Slika 7: Shema pipetiranja na 384 ploščico za določitev izražanja preiskovanih genov (prikazan je le del ploščice).

Slika 8: Fluorescenčna krivulja pomnoževanja PCR produkta, ki jo dobimo po končani PCR reakciji.

Slika 9: Rezultati uspešne reakcije qPCR.

Slika 10: Talilna krivulja uspešne optimizacije oligonukleotidnih začetnikov.

Slika 11: Talilna krivulja pri neuspešno optimizirani qPCR.

Slika 12: Povezanost med izražanjem genov.

Slika 13: Povprečne vrednosti izražanja za genske pare RANKL, OPG in VEGF-A.

Slika 14: Povezanost med izražanjem genov OPG in TXNRD1.

Slika 15: Povezanost med izražanjem genov OPG in VEGF-A.

Slika 16: Povezanost med izražanje genov za SOD2 in RANK v vzorcih subhondralne kosti.

Slika 17: Povezanost med izražanjem genov za TXNRD1 in RANK v vzorcih subhondralne kosti.

Slika 18: Linearna regresija med izražanjem gena za CAT in gena za RANK v vzorcih subhondralne kostnine.

Slika 19: Pozitivna korelacija v vzorcih subhondralne kostnine med izražanjem genov za RANK in SEPP1.

Slika 20: Razlike med povprečnimi vrednostmi izražanja za genske pare SOD2, TXNRD1, CAT in SEPP1.

SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica I: Pogoji, ki jih je treba zagotoviti pri reakcij qPCR.

Preglednica II: Pogoji, ki jih je treba zagotoviti, da dobimo talilno krivuljo.

Preglednica III: Priprava 100 nM reakcijske zmesi za qPCR za optimizacijo koncentracije oligonukleotidnih začetnikov za določene gene.

Preglednica IV: Priprava 1000 nM reakcijske zmesi za qPCR za optimizacijo koncentracije oligonukleotidnih začetnikov za določene gene.

Preglednica V: Priprava 600 nM reakcijske zmesi za qPCR za optimizacijo koncentracije oligonukleotidnih začetnikov za določene gene.

Preglednica VI: Priprava 100 nM reakcijske zmesi za qPCR za določitev referenčnega gena (GAPDH, RPLP0).

Preglednica VII: Priprava 600 nM reakcijske zmesi za qPCR za določitev referenčnega gena (vsi ostali geni).

Preglednica VIII: Priprava 100 nM reakcijske zmesi za vzorce subhondralne kostnine (za GAPDH).

Preglednica IX: Priprava 300 nM reakcijske zmesi za vzorce subhondralne kostnine (za VEGF-A).

Preglednica X: Priprava 600 nM reakcijske zmesi za vzorce subhondralne kostnine (za vse ostale).

Preglednica XI: Nukleotidno zaporedje načrtovanih oligonukleotidnih začetnikov.

Preglednica XII: Rezultati optimizacije genov.

Preglednica XIII: Rezultati izražanja 10 kandidatnih genov za določitev najboljšega referenčnega gena.

Preglednica XIV: Opis preiskovane skupine.

Preglednica XV: Srednje vrednosti izražanja za gene RANK, RANKL, OPG.

Preglednica XVI: Srednje vrednosti izražanja genov za antioksidativne encime.

Preglednica XVII: Vrednosti Pearsonovega koeficienta korelacije za gene, ki so bili signifikantno povezani z RANKL.

Preglednica XVIII: Vrednosti Pearsonove korelacije za gene, ki so pokazali statistično značilne povezave z izražanjem OPG.

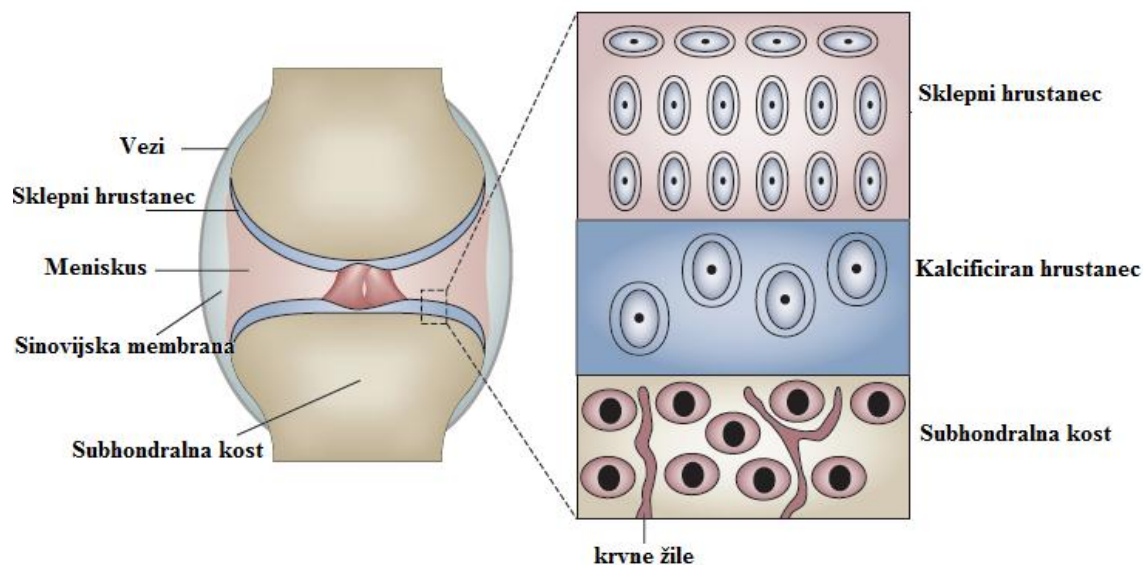
Preglednica XIX: Vrednosti Pearsonovega koeficienta korelacije za gene, ki so bili statistično značilno povezani z RANK.

1. UVOD

1.1. ZGRADBA SKLEPA

Sklep je organ, ki je sestavljen iz hrustanca, subhondralne kosti, mišic in sinovialne ovojnice ter sinovialne tekočine (slika 1). Subhondralna kostnina je sestavljena iz kortikalne subhondralne kostnine, ki se nahaja tik pod kalcificirano plastjo hrustanca in trabekularne subhondralne kostnine, ki se nahaja pod kortikalno plastjo (2). Kortikalna kost je neporozna in avaskularna. Trabekularna kost pa ima zaradi prepletene strukture veliko večjo površino in je tudi presnovno bolj aktivna. Nahaja se v neposredni anatomski bližini s kostnim mozgom, iz katerega izvirajo predhodniki kostnih celic in dejavniki, ki lokalno regulirajo kost (3). Sklepni hrustanec je elastično vezivno tkivo, sestavljeno iz ekstracelularnega matriksa (ECM), v katerem so razporejene celice hondrociti (10% mase hrustanca), in vode (80% mase hrustanca). Strukturno ogrodje ECM je iz kolagenske mreže (prevladuje kolagen tipa II), vanj so vgrajeni glikozaminoglikani in proteoglikani (glavni je agrekan). Agrekan tvori makromolekularne agregate s hialuronsko kislino, ta pa integrira s kolagenskimi vlakni. Sklepni hrustanec ne vsebuje krvnih žil in ni oživčen. Hondrociti se odzivajo na mehanske dražljaje, rastne dejavnike in citokine, kar vpliva na homeostazo hrustanca. Hondrociti v zdravem hrustancu odraslega človeka zelo počasi in nadzorovano sintetizirajo komponente ECM (4).

V sinovialni membrani se nahajajo metabolno aktivne celice, sinoviociti. Te celice odstranjujejo odpadne produkte iz prostora, ki ga obdajajo, hkrati pa oskrbujejo tudi hondrocite in proizvajajo hialuronsko kislino (4). Pod sinovialno membrano se nahaja sklepna tekočina, ki je viskozna in omogoča lažje gibanje sklepov. Vsebuje mazljive molekule kot sta proteoglikan-4 in hialuronan (5). Hrustancu dobavlja kisik in hrano (6).



Slika 1: Zgradba sklepa pri zdravem človeku (prirejeno po 8).

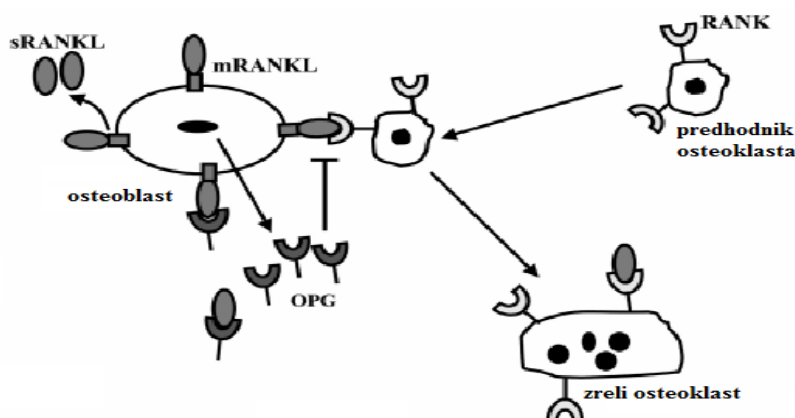
1.1.1. KOSTNA REMODELACIJA

Kost je v ravnovesju nenehnega nastajanja in razgradnje. Pri nastajanju in stalnem preoblikovanju sodelujejo kostne celice osteoblasti, osteociti in osteoklasti (7). Prvi korak remodelacije je odmik osteoblastov, ki prekrivajo mirujočo kostno površino. To privabi osteoklaste, ki se aktivirajo ob dotiku s površino. Pod njimi nastane poseben izoliran prostor, kjer se z izločanjem klorovodikove kisline ustvari kisel medij. Sem izločajo tudi številne proteaze (katepsin K, kolagenaze, metaloproteinaze) in encime, ki demineralizirajo kostno tkivo (tartrat rezistentna kislina fosfataza (TRAP)). Osteoklasti pod seboj povzročijo razgradnjo kostnega tkiva in nastanek resorpcijske votlinice oz. Howshipove lakune. Osteoklasti se nato odmaknejo in vstopijo v proces apoptoze. Howshipovo lakuno naselijo monociti in makrofagi, ki jo očistijo in pripravijo na prihod osteoblastov. Prične se proces tvorbe kosti (9). Osteoblasti sintetizirajo molekule organskega matriksa, ki med seboj polimerizirajo in tvorijo osteoid. Osteoid na koncu mineralizira, saj se nanj nalagajo soli mineralov. V mineraliziran osteoid se ujamejo osteoblasti in se preoblikujejo v osteocite (7). Na ravnovesje kostne remodelacije vpliva aktivnost kostnih celic ter delovanje lokalnih (npr. citokini, rastni dejavniki) in sistemskih mediatorjev (vitamin D, spolni hormoni, paratiroidni hormon, kalcitonin itd.) (9). Resorpcija poteka veliko hitreje kot tvorba kosti. Območje kosti se lahko resorbira v dveh do treh tednih, da se ta predel ponovno obnovi, pa traja vsaj tri mesece (10).

1.1.2. RANKL/ RANK/ OPG IN URAVNAVANJE KOSTNE RAZGRADNJE

Osteoblasti so v zapletenem razmerju z osteoklasti preko osi, sestavljene iz liganda receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B (RANKL), receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B (RANK) in osteoprotegerina (OPG). Osteoklasti na svoji površini izražajo RANK, na katerega se veže RANKL, ki sproži diferenciacijo osteoklastnih predhodnikov v osteoklaste in aktivacijo zrelih osteoklastov (11).

RANKL je homotrimerni transmembranski protein tipa II, ki je lahko v membransko vezani ali topni obliki. Veže se lahko na RANK in OPG. RANKL izločajo celice T, ki ob aktivaciji sprožijo povečano izražanje RANKL gena tudi v osteoblastih, to pa vodi v povečano osteoklastogenezo in razgradnjo kosti (9). RANK je transmembranski protein tipa I, ki se izraža samo v osteoklastih, osteoklastnih predhodnikih in dendritičnih celicah. Uvrščamo ga v družino receptorjev za dejavnike tumorske nekroze (TNFR, angl. tumor necrosis factor receptor). OPG je protein osteoblastov, ki se nahaja v topni obliki in prav tako spada v družino TNFR. Ima osteoprotektivno vlogo, saj z vezavo na RANKL kompetitivno inhibira interakcijo med RANKL in RANK ter tako zavre diferenciacijo in aktivacijo osteoklastov (11).

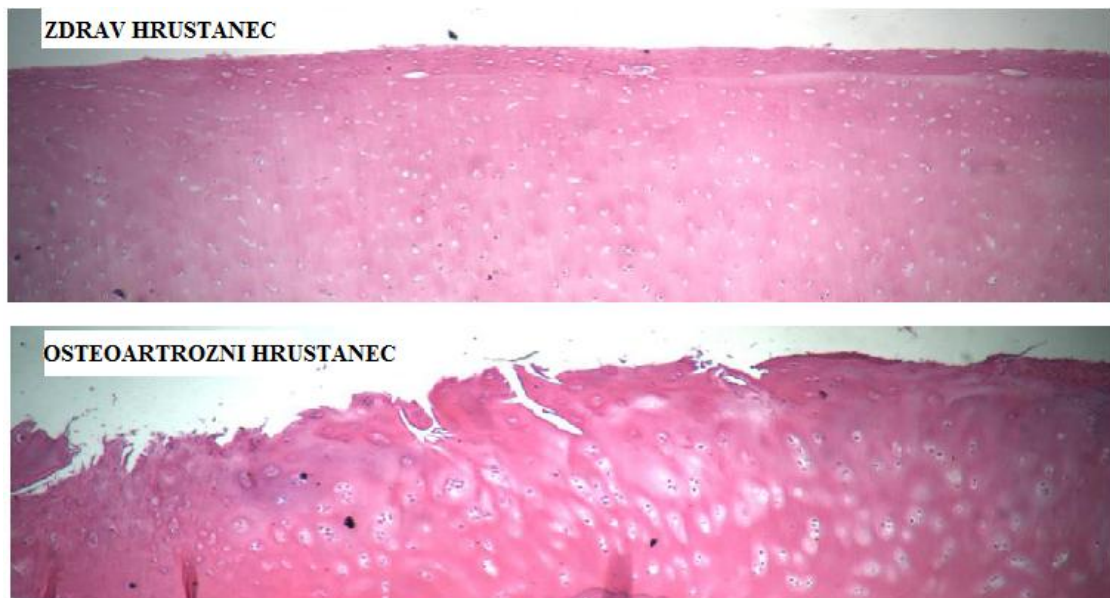


Slika 2: Delovanje osi RANKL/RANK/OPG na kostne celice (mRANKL = membranska oblika RANKL, sRANKL = topna oblika RANKL) (prirejeno po 12).

1.2. OSTEOARTROZA

Osteoartroza (OA) oz. osteoarthritis je bolezen sklepov, ki najpogosteje prizadene starejšo osebo po 55. letu starosti. Pojavijo se spremembe na kolkih, kolenih in distalnih interfalangealnih sklepih (13). Zanj je značilno propadanje sklepnega hrustanca, skleroza subhondralne kosti (hipertrofične spremembe), tvorba subhondralnih cist (nekrotični

predeli subhondralnih kosti) in osteofitov (4,13) ter blago vnetje sinovialne membrane (14). Z napredovanjem pride do sekundarnih sprememb ostalih sklepnih in ob sklepnih struktur (sinovialne membrane, fibrozne ovojnice in subhondralne kosti) in mehkih ob sklepnih struktur (kit in mišic). Poznamo primarno ali idiopatsko in sekundarno obliko OA. Pri primarni OA igrajo pomembno vlogo dedni dejavniki, spol, starost, hormonsko stanje in debelost (višji indeks telesne mase (ITM)) (13). Sekundarna oblika bolezni se razvije zaradi prirojenih ali razvojnih anomalij, po poškodbah in vnetjih sklepov, pri endokrinoloških in metabolnih boleznih, avaskularni nekrozi sklepa, hemoglobinopatijah in čezmernih mehaničnih obremenitvah (npr. pretirane športne aktivnosti). Novejše študije povezujejo OA celo s hipertenzijo, aterosklerozo, povečanimi vrednostmi holesterola in glukoze v krvi (13).



Slika 3: Histološki pregled zdravega in osteoartroznega hrustanca (prirejeno po 15).

1.2.1. PATOGENETSKI MEHANIZMI PRI OSTEOARTROZI

Prvi vidni znak OA je fibrilacija in disrupcija vrhnjih slojev sklepnega hrustanca, ki ga spremlja izguba vode in proteoglikanov. Hrustanec postaja vse tanjši, površina pa vse bolj hrapava, razpokana in nepravilna, vse dokler ne doseže spodaj ležeče subhondralne kosti. Na sklepnih robovih kostno tkivo proliferira, nastanejo osteofiti. Poveča se kostna vaskularizacija in remodelacija (4). Ker se kostna tvorba pospeši, nastane osteoid, ki je nemineralizirana nova kostnina. Subhondralna kost je v primerjavi z zdravo kostjo debelejša in bolj toga (8). Sproščanje delčkov hrustanca v sinovialno tekočino privede do

sinovitisa. Sledi neovaskularna infiltracija makrofagov in fibroblastov. Povišana koncentracija vnetnih mediatorjev vpliva na hondrocite, kar vodi v še večjo okvaro hrustanca (4).

1.2.2. SUBHONDRAKALNA KOSTNINA PRI OSTEOARTROZI

Že več desetletij se predvideva, da je v razvoj OA vpletena tudi subhondralna kost (SB), saj je subhondralna skleroza značilen znak napredovanja OA. Še vedno pa ni čisto jasno, ali je zvečana mineralna gostota SB posledica ali vzrok za OA (16). Živalski modeli kažejo, da se obraba hrustanca pojavi v delih sklepa, ki prekrivajo subhondralno kost z višjo mineralno kostno gostoto (MKG) (16). Številni avtorji zagovarjajo tezo, da se OA začne v subhondralni kosti in ne v hrustancu (17).

Nedavna opazovanja so pokazala, da je OA povezana z zgodnjo izgubo kosti zaradi večje kostne remodelacije, ki ji sledi počasna debelitev SB in popolna izguba hrustanca (16). V zgodnji fazi OA se debelina kortikalne subhondralne kosti zmanjša (18), saj npr. mehanski stres v hrustancu stimulira remodelacijo SB (14). Tanjšanje in poroznost kortikalne SB je prisotno le v medialnem predelu in je povezano s poškodbo hrustanca (18). Prvi znaki OA na celičnem nivoju so zvišana celična proliferacija in povečano matriksno preoblikovanje v hrustancu in SB (8). Presnova hrustanca se pospeši, hondrociti pa se v sklerotični SB diferencirajo v hipertrofične hondrocite, ki po vdoru krvnih žil propadejo (19). Hondrociti pospešeno sintetizirajo matriksne molekule in pro-vnetne citokine (IL-1 in MMP), s katerimi prispevajo k uničenju matriksa (8). Tako se zaradi porušene homeostaze hrustanca, pri razvoju OA, hrustanec tanjša in počasi izginja (14).

Vzporedno s temi hrustančnimi spremembami, se v spodaj ležeči kosti poveča celična aktivnost, ki vodi do subhondralne skleroze z odebelitvijo kortikalne plasti, obsežnega preoblikovanja trabekul in osteofitov. Spremembe v kortikalni in trabekularni SB so povezane z aktivacijo remodelacije kosti, verjetno kot prilagoditev na spremembe. Mehanske lastnosti kosti so odvisne od mineralizacije, ki vpliva na aktivnost osteoblastov in določa hitrost remodelacije (8).

Pri napredovani obliki OA se pojavi zvečana tvorba SB in vključuje samo kortikalno SB (16). Novo nastala debelejša kost nudi manjši upor in ima večjo komplianco kot tanjša SB, ki je prisotna v normalnem sklepu (8). Ko hrustanec propade, ga osteoklasti in osteoblasti nadomestijo s kostjo (14).

Pri OA se v SB lahko pojavijo nenormalni fenotipi osteoblastov, zvečana je aktivnost alkalne fosfataze in poveča se sproščanje osteokalcina. Prav tako pa zaznamo tudi nenormalne ravni drugih dejavnikov, kot so: transformirajoči rastni dejavnik- β (TGF- β), inzulinu podoben rastni dejavnik (IGF-1) in aktivator plazminogena urokinaznega tipa (uPA). Osteoblaste, ki se fenotipsko ne razlikujejo, lahko razdelimo v dve podskupini glede na raven endogenega prostaglandina E2 (PGE2): osteoblasti z nizko ali visoko proizvodnjo PGE2. Na podlagi tega lahko tudi OA paciente razvrstimo v skupine z nizko (L-OA) ali visoko proizvodnjo PGE2 (H-OA). Debelina SB v primerjavi z zdravo je pri L-OA zmanjšana in povečana pri bolnikih H-OA. Osteoblasti, OPG in RANKL so različno izraženi in posledično je razmerje OPG/RANKL pri L-OA zmanjšano, kar kaže na povečano subhondralno resorpcijo kosti in povečano pri H-OA, kar kaže na premik v smeri tvorbe kosti (20).

1.2.3. RANKL/RANK/OPG IN VEGF-A PRI OA

Ugotovljeno je bilo, da OPG in RANKL vplivata na preoblikovanje subhondralne kosti pri OA (20). Hondrociti izražajo gen za vsak protein iz osi RANK/RANKL/OPG, vendar je to odvisno od plasti in stanja hrustanca (zdrav/bolezensko spremenjen). Določeno je bilo izražanje OPG, RANK in RANKL v površinski coni pri zdravem hrustancu, pri OA pa so njihovo izražanje zaznali v sredinski coni. Trenutno še nimamo študij, ki bi dokazale njihovo funkcijo v hrustancu. Vezava OPG na RANKL zmanjša učinke RANKL. OPG se lahko veže tudi na ligand za z apoptozo spodbujenega dejavnika tumorske nekroze (TRAIL), ki spodbuja nekrozo hondrocitov in tako zavre to apoptozo. Vendar pa lahko anti-apoptotski učinek OPG pri OA škoduje, saj povzroči hiperplazijo celic sinovialne membrane. Tudi sinovialne celice lahko izražajo OPG, RANKL in RANK, ki sodelujejo pri eroziji kosti. Razmerje OPG/RANKL je veliko bolj povišano pri OA kot pri revmatoidnem artritisu (RA). Pri RA je kortikalna kost veliko bolj razgrajena kot pri OA. Številne študije na miših so pokazale, da TNF- α vsaj delno vpliva na osteoklastogenezo, ki prav tako povzroči erozijo kosti. Prekomerna osteoklastogeneza uniči mineralizirano tkivo, vključno s hrustancem in kortikalno SB (20).

Biokemične interakcije med SB in hrustancem naj bi omogočila vaskularizacija (14). Kot smo že omenili je hrustanec avaskularno tkivo, vnetje v sklepnem tkivu pa sproži povečano nastajanje žilnega endotelijskega rastnega dejavnika (VEGF), ki omogoči neovaskularizacijo v hrustancu. Ključno vlogo pri angiogenezi ima tako citokin VEGF, ki

nadzoruje angiogenezo in metabolizem hondroocitov (21). Inducira pa tudi osteoklastogenezo, tako da vpliva na povečano izražanje gena za RANKL, kar stimulira delovanje osteoklastov in spodbudi kostno resorpcijo (22). Angiogeneza poslabša vnetje, ki je prisotno v sklepu, kar vodi v postopno poškodbo sklepov (23). Vaskularizacija SB je povezana z resnostjo OA sprememb v hrustancu. V žilnih kanalih se nahajajo krvne žile, po katerih poteka izmenjava hranil, in osteoblastov ter osteoklastov. Na osteohondralnem stičišču so prisotni tudi senzorni živci, kar kaže na vlogo SB pri OA bolečini (14).

1.2.4. VPLIV OKSIDATIVNEGA STRESA IN PROSTIH RADIKALOV NA SUBHONDRALENO KOST PRI OSTEOARTROZI

Oksidativni stres je kemični stres, ki je prisoten v živih organizmih in je posledica povečane količine reaktivnih kisikovih spojin (ROS), ki škodljivo delujejo na celice in tkiva. Povečano nastajanje ROS in zmanjšanje učinkovitosti antioksidativnih sistemov vodi v patološko stanje organizma (24). Glavni vir kisikovih radikalov je dihalna veriga v mitohondriju (25). Obstajajo namreč dokazi, da pri OA pride do poškodbe DNA v mitohondrijih, kar povzroči mitohondrijsko disfunkcijo in povečano nastajanje ROS. ROS, ki izvirajo iz mitohondrija, v tkivu spodbudijo izražanje pro-vnetnih citokinov, ki povzročijo apoptozo hondroocitov (26). Majhne količine ROS nastajajo tudi v fizioloških stanjih med presnovo celic, sintezo nekaterih hormonov, obrambo pred mikroorganizmi, ipd. (24). Radikali pospešujejo celično staranje in apoptozo (25). Povečano količino radikalov lahko sprožijo tudi številni zunanji dejavniki, kot so različne vrste sevanja, nekatera zdravila, ter virusi in bakterije. Med notranje dejavnike lahko štejemo povečano stopnjo celične presnove, ki nastane pri določenih boleznih (debelost, sladkorna bolezen, rak...) ali pri intenzivni telesni obremenitvi pri neprilagojenem obrambnem sistemu antioksidantov (24). Pri OA je bilo dokazano, da ROS prizadenejo tako hrustanec, sklepna tkiva kot tudi subhondralno kost (25). ROS lahko neposredno oksidirajo nukleinske kisline, transkripcijske dejavnike, membranske fosfolipide in proteine ECM, kar pri OA vodi v okvaro biološke aktivnosti hondroocitov, celično smrt in razpad komponent matriksa (27). Pri OA lahko velikokrat opazimo vnetno preoblikovanje sinovialne membrane. ROS povzročijo infiltracijo aktiviranih celic B in T limfocitov in čezmerno izražanje vnetnih mediatorjev, kot so IL-1 α , IL-1 β in TNF- α (25).

1.3. OBRAMBA PRED OKSIDATIVNIM STRESOM

Zdrav organizem je sposoben z naravnim obrambnim sistemom preprečiti škodljivo delovanje prostih radikalov. Sestavljajo ga različni encimski sistemi in snovi, ki jih imenujemo antioksidanti (24). Za oksidativno poškodbo v hrustancu sta odgovorna dva glavna mehanizma. Do oksidacije najprej pride, ko je oslabljen antioksidativni sistem (25). Številne študije so pokazale korelacijo med starostjo in slabšim delovanjem antioksidativnega sistema (28). Povečana oksidativna poškodba znotraj hondrocitov, je torej vzrok za patološke spremembe hrustanca pri OA. Drugi najpomembnejši mehanizem, ki povzroči oksidativno poškodbo v hrustancu je prehrana sklepnega hrustanca. Ker je sklepni hrustanec avaskularno tkivo, morajo kisik in metabolni presnovki difundirati po relativno dolgi poti pri nizkem parcialnem tlaku kisika (pO_2). Povečanje pO_2 v hrustancu povzroči vnetje, ki ga okrepijo prosti radikali. Superoksidni anionski radikal ($O_2^{\bullet-}$), ki nastane pri oksidativnem metabolizmu v hrustancu, je odločilnega pomena za vzdrževanje medcelične signalizacije (25). Nedavno so ugotovili, da telesna vadba lahko zmanjša oksidativni stres v sklepih. Nasprotno pa prekomerno ponavljajoče se obremenitve povzročijo apoptozo hondrocitov. Mehanske obremenitve, ki presegajo toleranco sklepne površine, sprožijo sintezo ROS (25).

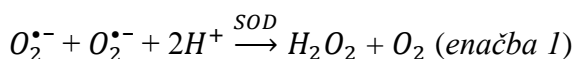
1.3.1. ANTIOKSIDATIVNI ENCIMI

Antioksidativni encimi lahko nevtralizirajo radikale, preprečijo njihov nastanek ali pa jih katalitično odstranijo (24). Dokazano je, da je nizka raven antioksidantov v plazmi ali serumu povezana z večjim tveganjem za razvoj RA, napredovanje bolezni in vnetni proces. Toksičnost ROS hondrociti preprečijo s pomočjo antioksidativnih encimov (27). Med endogene antioksidativne encime uvrščamo: superoksid-dismutazo, katalazo, peroksiredoksin, glutationski in tireodoksinški encimski sistem.

a) SUPEROKSID-DISMUTAZA (SOD):

SOD je encimski antioksidant, ki spada v skupino metaloproteinov (26). Katalizira reakcije dismutacije superoksidnega radikala ($O_2^{\bullet-}$) v molekulo vodikovega peroksida in kisika (24) (enačba 1) ter na ta način odstranjuje $O_2^{\bullet-}$ (26). Reakcija je spontana in počasna, zato lahko

$O_2^{\bullet -}$ oddifundira daleč od kraja nastanka. Tesno sodeluje z encimi, ki odstranjujejo H_2O_2 . To sta katalaza (CAT) in glutation peroksidaza (GPX) (29).

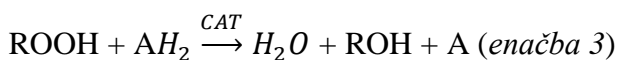
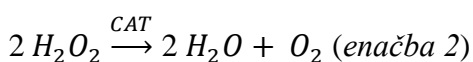


Glede na prostetične skupine ločimo tri oblike SOD: citoplazemska, ki ima v aktivnem mestu cink ali baker (Cu / Zn-SOD, SOD1), mitohondrijska SOD, ki vsebuje mangan (Mn-SOD, SOD2) in zunajcelična SOD (EC SOD, SOD3), ki vsebuje Cu in Zn. Njihova aktivnost se razlikuje od tkiva do tkiva, po večini je SOD aktivna v plazmi, vranici in sklepni tekočini (30).

Izražanje gena za SOD2 se začne zmanjševati že pred razvojem OA, najnižjo raven pa doseže v končni fazi OA hrustanca (31). Zmanjšano izražanje gena za SOD2 bi lahko bilo povezano s povečano metilacijo promotorja gena za SOD2 (26). Pomanjkanje encima SOD2 v kostnini, omogoči povečano proizvodnjo ROS in zmanjšano izražanje encima kolagenaze, kar kaže na kompleksno delovanje ROS (31).

b) KATALAZA (CAT):

Katalaza je hemoprotein, ki odstranjuje vodikov peroksid in tako preprečuje nastanek hidroksilnega radikala ($OH\bullet$) (24). Pri tem nastane voda in molekularni kisik (O_2) (enačba 2). Reagira lahko tudi z donorji protonov, kot so: metanol, etanol, mravljična kislina in fenoli (enačba 3).



Encimsko molekulo sestavljajo štiri podenote, vsaka podenota vsebuje hemsko skupino, ki je vezana na aktivno mesto. Katalaze najdemo v različnih tkivih, najbolj aktivne pa so v jetrih, eritrocitih in ledvicah. CAT ščiti celice pred H_2O_2 , ki nastaja v njih. Čeprav CAT za nekatere celice pod normalnimi pogoji ni bistvena, igra pomembno vlogo pri pridobivanju tolerance do oksidativnega stresa v celici (29). CAT torej regulira oksidativni stres in vnetje, lahko pa prispeva tudi k razvoju RA. Povišana aktivnost encima lahko zaščiti telo pred RA, tako da omeji nastanek produktov ROS in regulira izražanje genov, ki so vpleteni v vnetje (32). Dokazali so tudi, da je pri OA bolnikih aktivnost CAT precej zmanjšana, kar

omogoči večji oksidativni stres, zaradi povečane proizvodnje prostih kisikovih radikalov. Aktivnost CAT so izmerili po metodah Beers in Sizer in ne z izražanjem gena za CAT (33).

c) TIOREODOKSIN REDUKTAZA 1 (TXNRD1)

Tioredoxin (TXN) in tioredoksin reduktaza (TXNRD) dopolnjujeta encimski antioksidativni in redoksn sistem. Vključena sta v procese, ki so povezani z nastankom ROS. Sodelujeta predvsem pri regeneraciji mnogih antioksidantnih molekul, kot so npr. ubikinon, lipoična ter askorbinska kislina, ki jih ohranjata v aktivni reducirani obliki (24). Aktivno mesto TXN sestavljata dva sosednja cisteina, ki reverzibilno prehajata iz aktivne (reducirane) v oksidirano obliko. Ko sta aktivna, delujeta kot reducenta in reducirata ROS ali pa ohranjata druge antioksidativne proteine v aktivni reducirani obliki. Po deaktivaciji TXNRD1 z NADPH, ki deluje kot elektron donor, se TXN regenerira v njegovo aktivno obliko (34).

Oksidoreduktazni encim TXNRD je piridin nukleotid-disulfid. Za katalitično aktivnost je bistven selenocistein. Protein je flavoencim, ki za redukcijo disulfidov na TXN kot substrat uporablja NADPH. Motnje na lokusu prenašalne ribonukleinske kisline (tRNA) selenocisteina vodijo do inaktivacije TXNRD. Poznamo tri različne TXNRD izoforme: citoplazemska (TXNRD1), mitohondrijska (TXNRD2) in TXNRD3, ki se nahaja v testisih. Molekule, ki vsebujejo tiolne skupine, so še posebej občutljive na oksidacijo. Sistem TXNRD/TXN ima pomembno vlogo pri ohranjanju ali obnavljanju tiolov in citoplazemske TXNRD1/TXN1. TXNRD1/TXN1 sodelujeta pri vzdrževanju redoks stanja. Motnje tega sistema v tkivu lahko povzročijo kroničen oksidativni stres (35). Povečana koncentracija TXN in TXNRD v sklepnih tekočini in tkivu je značilna predvsem za RA. Raven TXN in TXNRD v sklepu pri RA je povezana s stopnjo lokalnega vnetja (36). TXNRD1 zavira vodikov peroksid in tako prepreči apoptozo sinovialnih celic (37).

d) SELENOPROTEIN P (SEPP1)

SEPP je zunajcelični glikoprotein, ki v aktivnem mestu vsebuje veliko selenocisteina. Vsi selenoproteini vsebujejo en atom selena, ki je vezan na cistein, SEPP pa namesto enega vsebuje deset atomov. V SEPP je vezanega 50% celotnega selena v plazmi. Ima dve domeni, ki vsebujeta selen. V N-terminalnem delu proteina se nahaja en selenocisteinski

ostanek, medtem ko je ostalih devet v C-terminalnem delu (38,39). Prenos Se do celic poteka preko aminokislina cistein (40).

SEPP je encim, ki sodeluje v redoks-reakcijah. V prisotnosti glutationa deluje kot zaščitni encim oksidativnega stresa plazemske membrane. Pomemben vir reducentov, ki aktivirajo delovanje SEPP, predstavlja glutation, ki ga celica sprosti v plazmo. Deluje kot lovilec peroksinitritov ali kot faktor, ki omogoči normalno delovanje oz. preživetje nevronov. SEPP torej deluje kot antioksidant v zunajceličnem prostoru. Pomanjkanje SEPP je lahko posledica prenizkih koncentracij selena v telesu in ciroze jeter. Pomembno je torej zagotoviti zadosten vnos Se, da lahko organizem zagotovi optimalno delovanje imunskega sistema (38,39). Encim se izraža predvsem v jetrih, od koder preide v plazmo in ostala tkiva, kot so: možgani, ščitnica, prostata in mlečne žleze (40). Študije na transgenih miših so pokazale, da je ohranjanje selenoproteinske dejavnosti bistveno za vzdrževanje MKG in hrustanca. Plazemska koncentracija Se je obratno sorazmerna z razgrajevanjem kostnine in pozitivno korelira z MKG. Zadosten vnos selena igra pomembno vlogo pri uravnavanju vnetja in diferenciaciji kostnih celic. S selenskim zdravljenjem lahko zatremo inducirano izražanje genov za RANKL, tako da zmanjšamo nastajanje ROS in zavremo signalizacijo za diferenciacijo osteoklastov. SEPP1 lahko tako predstavlja zaščito pred RA, OA, osteoporozo in ROS (41).

e) ALDEHID OKSIDAZA (AOX1)

AOX je presnovni encim, ki se nahaja v citoplazmi številnih tkiv. Encim je aktiven homodimer, ki ga sestavljata dve identični podenoti. Je molibden-flavoprotein in v svojem aktivnem mestu vsebuje molibden. Vsaka podenota je razdeljena na tri področja: N-terminalna domena, ki vsebuje železo, domena, ki vsebuje flavin adenin dinukleotid (FAD) in C-terminalna domena, kjer se nahaja kofaktor molibden. Za encimsko katalizo sta pomembna molibden in FAD. Njegova fiziološka funkcija še ni popolnoma znana. Katalizira oksidacije, kot akceptor elektronov pa uporablja le molekularni kisik, ki ga dobi iz vode. Oksidira lahko širši spekter substratov, kot so spojine, ki vsebujejo: aldehyd, nitro/nitrozo skupino ali N-heterocikel. Oksidacija N-heterociklov vključuje nukleofilni napad na ogljikov atom. Katalizira lahko tudi oksidirane vmesne presnovke encima citokrom oksidaze P450 (CYP450) in monoaminooksidaze (MAO) (42).

V prisotnosti kisika in vode AOX pretvori aldehyd v karboksilno kislino, pri tem pa nastane vodikov peroksid (enačba 4) (42).

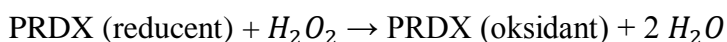


Predvideva se, da ekspresijo AOX povzroči prisotnost dušikovega oksida. NO pogosto nastane hkrati z ROS. Transkripcijsko represorni protein (NsrR) regulira odziv NO in tako posreduje odgovor. Encim je sestavni del mitohondrijskega elektronskega prenosa in lahko zmanjša nastajanje ROS (43).

f) PEROKSIREDOKSIN-5 (PRDX5)

PRDX5 je antioksidativni encim, ki ima zaščitno vlogo v različnih tkivih pri normalnih pogojih in tudi med vnetnim procesom. Preko tioredoksinkega sistema z redukcijo ekvivalentov zmanjša koncentracijo vodikovega peroksida in alkil hidroperoksidov. Prisoten je v širšem znotrajceličnem območju vključno z mitohondrijem, peroksisomom in citoplazmo (44). V aktivnem mestu encima se nahaja cistein, ki je odgovoren za antioksidativno aktivnost (45).

Encim reducira vodikov peroksid in pri tem nastane voda, sam pa se oksidira. Ker je oksidirana oblika neaktivna, PRDX uporabi tioredoksin, da se lahko ponovno aktivira. Reduciran TXN mu donira elektrone, da lahko PRDX obnovi svojo katalitično aktivnost (enačba 5) (45).



V hrustancu ima zaščitno vlogo pred oksidativnim stresom. Do povečane PRDX5 pride tudi pri degeneraciji kit. V primerjavi z normalnim hrustancem se v osteoartritičnem hrustancu ekspresija PRDX5 v hondrocitih bistveno poveča. Pomembni modulatorji, ki povečajo izražanje PRDX5, so citokini, npr. IL-1 β in TNF. S tem ko citokini stimulirajo nastajanje vodikovega peroksida, pospešijo izražanje encima (46).

g) GLUTATION-S-TRANSFERAZA P1 (GSTP1)

Glutation-S-transferaze na podlagi njihovih biokemičnih, imunoloških in strukturnih lastnosti razvrščamo v štiri glavne razrede: alfa (α), mu (μ), pi (π), theta (θ). GSTP1 spada v razred π in je antioksidativni encim, ki preprečuje lipidno peroksidacijo. Največja koncentracija tega encima je v jetrih. Zavira mitogen-aktivirano protein kinazno pot, preko katere se inducira apoptoza celic, ki jo stimulira oksidativni ali kemični stres (47).

Dokazali so, da se izražanje gena GSTP1 pri OA zmanjša, pri RA pa poveča (48). GSTP1 je tako pomemben predvsem pri RA, kjer lahko prepreči lipidno peroksidacijo (49), saj se le-tu poveča aktivnost sinovialnih fibroblastov, ki nenormalno hitro izločajo pro-vnetne citokine in kolagen, ki povzroči fibrozo (50).

2. NAMEN DELA

Vnetni citokini in oksidativni stres ter s tem prekomerno nastajanje prostih radikalov igrajo pomembno vlogo tudi v patogenezi OA (28). Oksidativni stres dokazano vpliva tudi na povečano apoptozo hondrocitov (51).

Čeprav se je OA v preteklosti je veljala za bolezen hrustanca, prizadene vse strukture v sklepu. V zadnjem času se v patogenezi OA veliko raziskuje vloga subhondralne kosti. Namen našega dela je ugotoviti povezavo med izražanjem genov za antioksidativne encime, glavne označevalce angiogeneze, VEGF-A in geni signalne poti v kostnem tkivu, RANK/RANKL/OPG. Uporabili bomo vzorce subhondralne kostnine 21 preiskovancev brez znanih bolezni kosti ali sklepov. V teh vzorcih bomo izmerili izražanje genov osi RANK/RANKL/OPG in 7 genov, ki kodirajo antioksidativne encime, kot so SOD2, SEPP1, AOX1, GSTP1, PRDX5, CAT, TXNRD1, in označevalec angiogeneze VEGF-A z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR). Pred tem bomo za te vzorce določili še par najbolj stabilno izraženih referenčnih genov, ki nam bo služil za normalizacijo preiskovanih genov. Za določitev stopnje in značilnosti povezav med izmerjenimi geni v subhondralni kosti, bomo uporabili statistične metode in za statistično značilne povezave določili stopnjo povezanosti.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. VZORCI

Vzorci subhondralne kosti so bili odvzeti 21 preiskovancem *post mortem*, ki so bili napoteni na obdukcijo na Inštitut za sodno medicino, Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani. V študijo smo vključili preiskovance brez anamneze kostnih bolezni ali bolezni sklepov. Prav tako so bili izključeni vsi preiskovanci z endokrinološkimi boleznimi, cirozo jeter ali katerokoli boleznijo, za katero obstajajo predhodni znanstveni dokazi, da ima vpliv na presnovo kosti. Izključeni so bili tudi preiskovanci, za katere smo imeli podatke, da so jemali zdravila, ki bi lahko vplivala na proces kostne presnove. Pred odvzemom vzorca je bil narejen tudi makroskopski pregled hrustanca z namenom ugotoviti, ali so opažene osteoartrozne spremembe hrustanca in v kakšnem deležu. Izsek kostnine skupaj s hrustancem je bil odvzet iz najbolj obremenjenega dela glave stegenice. Vzorec je bil do izolacije RNA shranjen v tekočem dušiku.

3.2. IZOLACIJA IN VREDNOTENJE RNA

Celokupna RNA je bila predhodno izolirana iz subhondralne kostnine, ovrednotena in prepisana v cDNA. Kostnino so homogenizirali s krogličnim mlinčkom Mikro-Dismembrator S (Sartorius AG, Nemčija) in kostno tkivo ves čas hladili s tekočim dušikom. Približno 100 mg uprašene subhondralne kostnine so prenesli v lizirajoči reagent QIAzol (Qiagen, Evropa).

Celokupno RNA so izolirali s pomočjo komercialnega reagenčnega kompleta RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Nemčija) (52). Izolirano celokupno RNA so resuspendirali v vodi brez RNaz (HyClone, Thermo Scientific, Nemčija) in shranili na -80°C .

Čistost in koncentracijo izolirane celokupne RNA so določili z merjenjem absorbance (A) pri valovni dolžini 230 nm, 260 nm, 280 nm s pomočjo UV/VIS spektrofotometrije. Ker nukleinske kisline absorbirajo pri 260 nm, lahko z merjenjem absorbance pri tej valovni dolžini določimo koncentracijo RNA. Pri valovni dolžini 280 nm absorbirajo proteini, pri 230 nm pa fenoli in ostale organske nečistote, ki zaostanejo med postopkom izolacije RNA. Razmerje A_{260}/A_{280} nm nam tako poda oceno čistosti izolirane RNA. Da je čistost

zadovoljiva, mora to razmerje znašati 1,8 – 2,0. Dobljene nižje vrednosti nakazujejo na prisotnost nečistot v vzorcu (53).

Kemikalije:

- QIAzol lizni reagent (Qiagen, Nemčija)
- kloroform
- 95% in 75% etanol (Merck, Nemčija)
- ultračista voda brez RNAz, HyClone (Thermo Scientific, Nemčija)

3.3. PREPIS RNA V cDNA

Informacijske RNA (mRNA) molekule so zelo neobstoje, saj se zaradi prisotnih ribonukleaz (RNaz) hitro razgradijo. Za lažje rokovanje se mRNA s pomočjo encima reverzna transkriptaza prevede v komplementarno verigo deoksiribonukleinske kisline (cDNA) (54). Reverzna transkriptaza je encim, pridobljen iz RNA retrovirusa. Da se mRNA lahko obratno prepíše v cDNA, je potrebno dodati ustrezne oligonukleotidne začetnike, encim reverzno transkriptazo, zmes deoksinukleozid-trifosfatov (dNTP) in inhibitor ribonukleaze (55). mRNA je bila predhodno prepisana z uporabo kita High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Nemčija). Dobljeno cDNA, ki je bolj stabilna, smo nato uporabili v verižni reakciji s polimerazo v realnem času, da smo lahko kvantitativno določili mRNA preiskovanih genov.

3.4. KVANTITATIVNA VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU (qPCR)

3.4.1. MATERIALI IN APARATURE

Uporabljene kemikalije:

- SYBR Select Master Mix (Life Technologies, Evropa)
- oligonukleotidni začetniki za gene: COL1A1, SOD2, MMP1, SEPP1, AOX1, GSTP1, PRDX5, VEGFA, RANKL, RANK, OPG, CAT, TXNRD1 (Sigma Aldrich, Nemčija)
- oligonukleotidni začetniki za referenčne gene: ACTB, B2M, GAPDH, GUSB, TBP, RPLP0 (Sigma Aldrich, Nemčija)
- ultračista voda

SYBR Select Master Mix je dvakrat koncentrirana zmes reagentov, ki vsebuje vse sestavne dele, ki so potrebni za sintezo qPCR produkta. Ta mešanica vsebuje barvilo SYBR Green I, Taq DNA polimerazo, dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) z dUTP, MgCl₂ v ustreznem pufu (56).

Oprema:

- centrifuga za ploščico: CENTRIC 322A (Tehtnica, Slovenija)
- PCR aparatura: LightCycler®480 II (Roche Diagnostics, Nemčija)
- komora za PCR z UV lučjo
- vibracijski mešalnik za epruvete (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Nemčija)

Laboratorijski material:

- nastavki za pipete
- pipete
- plastične epruvete Eppendorf z zamaškom 1,5 ml ali manjše (epice)
- mikrotiterska ploščica s 384 vdolbinicami
- zaščitna folija (LightCycler sealing foil, Roche Diagnostics, Nemčija)

qPCR je metoda, s katero lahko pomnožimo tarčni odsek DNA in hkrati merimo količino PCR produkta v vsakem ciklu med samo reakcijo. Pomnoževanje in detekcija potekata sočasno (54,57).

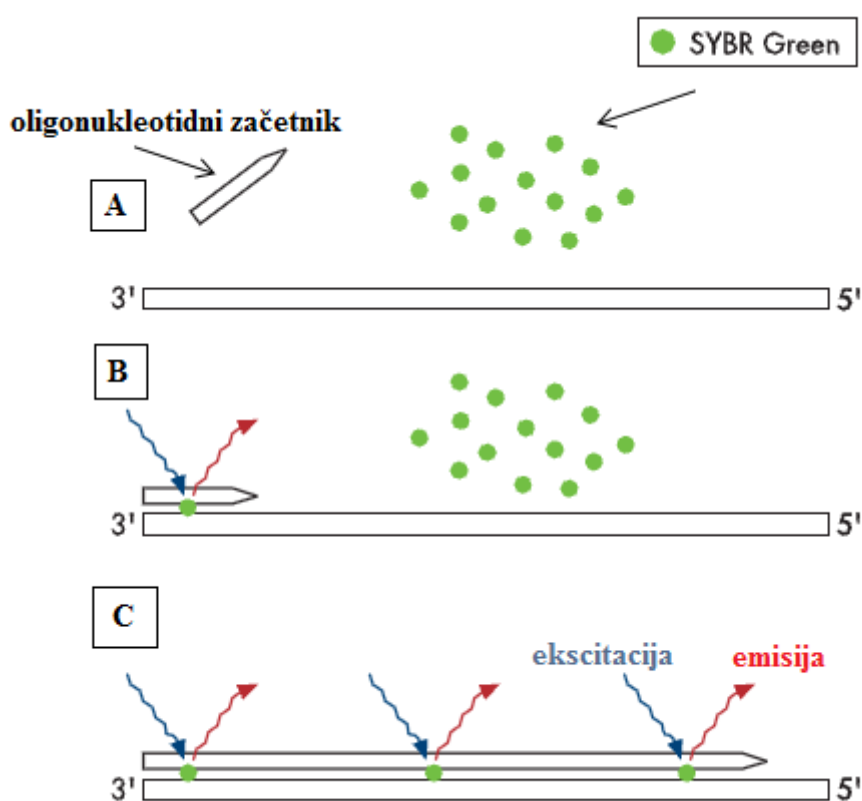
PCR reakcija poteka v treh glavnih fazah (po navadi poteče 40 ciklov):

1. Denaturacija poteka pri 95°C. Dvoverižna DNA veriga se razklene in dobimo dve enovijačni verigi.
2. Prileganje oligonukleotidnih začetnikov na komplementarno zaporedje v enovijačni molekuli DNA. Ustrezna temperatura temelji na izračunani talilni temperaturi (T_m) oligonukleotidnih začetnikov (T_m – 5 °C).
3. Podaljševanje verige poteka pri 70°C – 72°C, saj je takrat aktivnost DNA polimeraze optimalna. Če je tarčni ampikon majhen, sta fazi prileganja in podaljševanja pri temperaturi 60°C pogosto združeni v eno (58).

Kontinuirano spremljanje poteka reakcije v vsakem ciklu nam omogoči, da izmerimo količino produkta PCR, ko je reakcija še v eksponentni fazi. Detekcija produktov temelji na merjenju fluorescence s pomočjo fluorescenčnih barvil, ki se tekom reakcije vgradijo v

nastajajočo dvojno vijačnico. Poznamo dva načina detekcije: fluorescentna barvila, ki se nespecifično vgradijo v verigo DNA (npr. SYBR Green I), in sonde, ki so označeni s fluorofori in se vežejo na specifični odsek, ki se pomnožuje.

V naši raziskavi smo uporabili SYBR Green I, ki ima manjšo specifičnost od ostalih načinov detekcije, saj z njim detektiramo vsako dvovertižno DNA in ne samo želenih, specifičnih produktov (54,57). SYBR Green I ima ekscitacijski in emisijski maksimum pri 494 nm in 521 nm (55). Slika 4 prikazuje način detekcije dobljenih produktov PCR v realnem času s SYBR Green I.



Slika 4: Detekcija produktov qPCR s SYBR Green I. A- Barvilo SYBR Green samo ne prepozna nukleotidnega zaporedja, specifičnost pomnoževanja je odvisno od nukleotidnega začetnika. B- Barvilo SYBR Green I in oligonukleotidni začetnik se vežeta na določeno nukleotidno zaporedje. C- Ob vezavi barvila SYBR Green I v nastajajočo dvovijačnico DNA, se poveča fluorescenca. (Prirejeno po 55).

Z optimizacijo reakcije zmanjšamo nastanek nespecifičnih produktov in dimerov oligonukleotidnih začetnikov. Reakcija poteka v cikličnem termostatu z detektorjem, ki v vsakem ciklu izmeri fluorescenco (54,57). Ta metoda se lahko uporabi za absolutno

kvantifikacijo (npr. določanje števila genov), relativno kvantifikacijo (npr. študije genskega izražanja), alelna diskriminacijo in študije prisotnosti ali odsotnosti genskega zapisa (54).

qPCR smo uporabili za analizo izražanja preiskovanih genov. Vsi koraki našega eksperimentalnega dela v qPCR so potekali pod enakimi pogoji, ki so navedeni v preglednici I. Kot je razvidno iz preglednice I, je v našem primeru najprej pri 50°C 2 minuti potekala aktivacija encima uracil DNA-glikozilaze (UDG). Tako se prepreči prenos kontaminacije iz predhodnega pomnoževanja vzorca. UDG cepi uracil iz fosfodiesterске strukture DNA, ki namesto dTTP vsebuje dUTP in predstavlja navzkrižno kontaminacijo. Kasneje se UDG pri višji temperaturi inaktivira. Prenos kontaminacije se učinkovito nadzoruje, če viri kontaminacije vsebujejo bazo uracil namesto timina (59). Ker je bila talilna temperatura oligonukleotidnih začetnikov višja od 60°C, smo koraka prileganja in podaljševanja združili v eno fazo.

Preglednica I: Pogoji, ki jih je treba zagotoviti pri reakcij qPCR. Ko se preseže T_m , je 50% vijačnice razklenjene. (UDG= uracil DNA-glikozilaza, T_m = talilna temperatura)

| Stopnja reakcije PCR | T (°C) | Čas | Št.ciklov |
|--------------------------|---------------------|-------|-----------|
| Aktivacija UDG | 50 | 2 min | 1 |
| Začetna denaturacija | 95 | 2 min | 1 |
| Denaturacija | 95 | 15 s | 40 |
| Prileganje/podaljševanje | 60 $T_m \geq 60$ | 1 min | 40 |

Preglednica II: Pogoji, ki jih je treba zagotoviti, da dobimo talilno krivuljo.

| Stopnja reakcije PCR | T (°C) | Hitrost (°C/min) | Čas |
|----------------------|--------|------------------|--------|
| Aktivacija | 4 | | 30 s |
| Začetna denaturacija | 65–97 | 2,5 | |
| Denaturacija | 95 | | 10 min |

3.4.2. RAZVOJ METODE ZA OPTIMIZACIJO KONCENTRACIJE OLIGONUKLEOTIDNIH ZAČETNIKOV

Sterilizacija materiala in priprava komore za PCR:

Plastične epruvete z zamaškom in nastavke za pipete smo sterilizirali v avtoklavu 20 min pri tlaku 1,3 bara in temperaturi 121°C ter še 5 min pri T 134°C. Pred vsakim delom v komori za PCR smo celotno delovno površino dezinficirali s 3% hipokloritom in nato še 15 min komoro izpostavili UV-svetlobi. Tako smo zmanjšali verjetnost kontaminacije naše reakcijske zmesi in vzorcev cDNA med samo pripravo reakcijske zmesi za qPCR.

Priprava reagentov:

Najprej smo iz zmesi več vzorcev z izhodiščno koncentracijo cDNA 100 ng/μL pripravili standardne raztopine za izdelavo standardne krivulje. Koncentracije standardov (st) so znašale: st1 (5,0 ng/μL), st2 (2,5 ng/μL), st3 (1,25 ng/μL), st4 (0,625 ng/μL), st5 (0,313 ng/μL), st6 (0,156 ng/μL). Eden od vzorcev z oznako SB29 je bil v procesu reverzne transkripcije pripravljen tako, da mu nismo dodali encima reverzne transkriptaze (SB29-RT). Ker se mRNA v odsotnosti reverzne transkriptaze ne more pretvotiti v cDNA, je ta vzorec služil za potrditev odsotnosti pomnoževanja genomske DNA (gDNA) v reakciji qPCR. gDNA nam lahko v vzorcu cDNA zaostane zaradi nespecifičnosti postopka izolacije RNA. Vzorec SB29-RT smo redčili na enako koncentracijo kot standard 2. Vse vzorce smo redčili z ultračisto vodo. V vsaki seriji vzorcev smo naredili tudi več slepih kontrol (NTC; angl. nontemplate control), kjer smo namesto cDNA dodali ultračisto vodo.

Priprava reakcijske zmesi:

Za določitev optimalne koncentracije oligonukleotidnih začetnikov, pri kateri se bodo le-ti vezali na specifično mesto v cDNA, smo pripravili reakcijsko zmes za qPCR s koncentracijami oligonukleotidnih začetnikov 100 nM in 600 nM. Samo pri paru oligonukleotidnih začetnikov za gen GSTP1 smo na mesto 100 nM pripravili višjo koncentracijo 1000 nM. Da mora biti koncentracija oligonukleotidnih začetnikov za ta gen višja kot pri ostalih, so nam pokazali predhodni rezultati na drugem tkivu. V 2 mL plastične epruvete z zamaško (epice) smo odpipetirali sestavine za reakcijsko zmes, ki je bila sestavljena iz komercialno dostopnega reagenčnega kit SYBR Select MM kompleta (Life Technologies, Europe), ki vsebuje vse potrebne komponente za qPCR reakcijo, dodali smo samo ultračisto vodo in oligonukleotidne začetnike, specifične za vsak

preiskovani gen. Najprej smo odpipetirali vodo, nato SYBR Select MM in na koncu oligonukleotidne začetnike F in R, zaradi majhnih volumnov. Ko smo dodali vse sestavine, smo epice dobro premešali na vibracijskem mešalniku Vortex (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Nemčija). V vdolbinice na ploščici s 384 vdolbinami smo odpipetirali 10 µL reakcijske zmesi. Nato pa smo po spodnji shemi (slika 5) v vsako vdolbinico dodali še 5 µL standardne raztopine ali ultračiste vode ali SB29-RT. Končni volumen reakcijske zmesi odpipetiran na ploščico je znašal 15 µL.

Preglednice III, IV, V prikazujejo pripravo reakcijske zmesi.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|----|-----|----|-----|----|----|---------|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |
| A | st1 | - | st2 | - | st3 | - | st4 | - | st5 | - | st6 | - | NTC | - | - | SB29-RT | - |
| B | 600 | - | NTC | - | - | | | | | | | | | | | | |

Slika 5: Shema prikazuje pipetiranje na ploščico s 384 vdolbinami pri optimizaciji koncentracije oligonukleotidnih začetnikov (shema prikazuje le del ploščice 384). Po takšnem vzorcu pipetiramo vsak gen posebej.

Preglednica III: Priprava 100 nM reakcijske zmesi za qPCR za optimizacijo koncentracije oligonukleotidnih začetnikov za določene gene.

| Koncentracija | 100 nM | |
|------------------------------|--------------|--------------|
| oligonukleotidnih začetnikov | | |
| Število vzorcev | 1 x | 18 x |
| Sestavine | Volumen (µL) | Volumen (µL) |
| Ultračista voda | 2,350 | 42,3 |
| F-oligonukleotidni začetnik | 0,075 | 1,35 |
| R-oligonukleotidni začetnik | 0,075 | 1,35 |
| SYBR Select MM 2x | 7,5 | 135 |
| cDNA | 5,0 | |
| Celotni volumen | 15 | |

Preglednica IV: Priprava 1000 nM reakcijske zmesi za qPCR za optimizacijo koncentracije oligonukleotidnih začetnikov za določene gene.

| Koncentracija | 1000 nM | |
|-------------------------------------|----------------|--------------|
| oligonukleotidnih začetnikov | | |
| Število vzorcev | 1 x | 18 x |
| Sestavine | Volumen (μL) | Volumen (μL) |
| Ultračista voda | 1,0 | 18 |
| F-oligonukleotidni začetnik | 0,75 | 13,5 |
| R-oligonukleotidni začetnik | 0,75 | 13,5 |
| SYBR Select MM 2x | 7,5 | 135 |
| cDNA | 5,0 | |
| Celotni volumen | 15 | |

Preglednica V: Priprava 600 nM reakcijske zmesi za qPCR za optimizacijo koncentracije oligonukleotidnih začetnikov za določene gene.

| Koncentracija | 600 nM | |
|-------------------------------------|---------------|--------------|
| oligonukleotidnih začetnikov | | |
| Število vzorcev | 1 x | 18 x |
| Sestavine | Volumen (μL) | Volumen (μL) |
| Ultračista voda | 1,6 | 8 |
| F-oligonukleotidni začetnik | 0,45 | 2,25 |
| R-oligonukleotidni začetnik | 0,45 | 2,25 |
| SYBR Select MM 2x | 7,5 | 37,5 |
| cDNA | 5,0 | |
| Celotni volumen | 15 | |

Preverili smo oligonukleotidne začetnike za gene: COL1A1, SOD2, MMP1, SEPP1, AOX1, GSTP1, PRDX5, ACTB, TBP, B2M, GAPDH, VEGFA, RANKL, RANK, OPG, CAT in TXNRD1. Ker je šlo za začetno optimizacijo qPCR, smo delali le dve ponovitvi za 100 nM in 1000 nM koncentracije oligonukleotidnih začetnikov. V dvojniku smo naredili tudi SB29-RT, NTC pa v trojniku. Ko smo pipetirali 600 nM ali 1000 nM reakcijsko zmes, smo to naredili v dvojniku in mu dodali samo standardno raztopino 2. NTC smo naredili v trojniku, SB29-RT pa smo naredili le pri koncentraciji 100 nM oligonukleotidnih začetnikov. Na koncu smo ploščico prekrili s prozorno zaščitno folijo (LightCycler sealing

foil, Roche), jo 5 minut centrifugirali pri 2300 obratih/minuto in vstavili v PCR aparaturo LightCycler 480 II ter izvedli reakcijo pod pogoji, opisanimi v preglednici I.

V nadaljnjem eksperimentu smo uporabili 600 nM oligonukleotidne začetnike, saj je taka koncentracija omogočila boljše izražanje preiskovanih genov, kar smo dokazali z nižjo točko prehoda (C_p, angl. crossing point) za te koncentracije oligonukleotidnih začetnikov.

3.4.3. RAZVOJ METODE ZA DOLOČEVANJE REFERENČNEGA GENA

V našem poizkusu smo med šestimi najpogosteje uporabljenimi referenčnimi geni ACTB, TATA, B2M, GAPDH, GUSB in RPLP0 določili dva, ki sta najbolj primerna za naše vzorce subhondralne kosti. Določitev smo izvedli na desetih vzorcih cDNA subhondralne kosti, in sicer na petih vzorcih z najvišjim deležem kostnine in na petih vzorcih z najnižjim deležem kostnine, ki je bil predhodno določen z metodo mikroročunalniške tomografije.

Potek:

Ponovno smo iz izhodiščne koncentracije cDNA 100 ng/μL pripravili standardne raztopine: st1 (5,0 ng/μL), st2 (2,5 ng/μL), st3 (1,25 ng/μL), st4 (0,625 ng/μL), st5 (0,313 ng/μL) in st6 (0,156 ng/μL). Reakcijska zmes za qPCR je vsebovala enake sestavine kot pri optimizaciji oligonukleotidnih začetnikov. Koncentracija oligonukleotidnih začetnikov za gene ACTB, B2M, GUSB in TBP je znašala 600 nM, saj smo predhodno pri tej vrednosti dobili najboljše rezultate. Za gena GAPDH in RPLP0 pa je zadoščala 100 nM koncentracija oligonukleotidnih začetnikov.

Preglednici VI in VII prikazujeta pripravo reakcijske zmesi za določitev referenčnega gena s qPCR.

Preglednica VI: Priprava 100 nM reakcijske zmesi za qPCR za določitev referenčnega gena (GAPDH, RPLP0).

| Koncentracija | | 100 nM |
|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| oligonukleotidnih začetnikov | | |
| Število vzorcev | 1 x | 59 x |
| Sestavine | Volumen (μL) | Volumen (μL) |
| Ultračista voda | 2,35 | 138,65 |
| F-oligonukleotidni začetnik | 0,075 | 4,425 |
| R-oligonukleotidni začetnik | 0,075 | 4,425 |
| SYBR Select MM 2x | 7,5 | 442,5 |
| cDNA | 5,0 | |
| Celotni volumen | 15 | |

Preglednica VII: Priprava 600 nM reakcijske zmesi za qPCR za določitev referenčnega gena (vsi ostali geni).

| Koncentracija | | 600 nM |
|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| oligonukleotidnih začetnikov | | |
| Število vzorcev | 1 x | 59 x |
| Sestavine | Volumen (μL) | Volumen (μL) |
| Ultračista voda | 1,6 | 94,4 |
| F-oligonukleotidni začetnik | 0,45 | 26,55 |
| R-oligonukleotidni začetnik | 0,45 | 26,55 |
| SYBR Select MM 2x | 7,5 | 442,5 |
| cDNA | 5,0 | |
| Celotni volumen | 15 | |

Na ploščico s 384 vdolbinami smo najprej po spodnji shemi (slika 6) za vsak gen posebej napipetirali 10 μL reakcijske zmesi in 5 μL raztopine ustreznih standardov z znano koncentracijo. Tako smo dobili standardno krivuljo. Vsak standard smo naredili v trojniku, NTC pa v petih nanosih. Sledilo je vnašanje 5 μL desetih različnih vzorcev (SB21, SB22, SB23, SB25, SB27, SB28, SB30, SB33, SB34, SB37) v reakcijsko zmes. Tudi vsak vzorec smo naredili v trojniku. Po končanem nanosu smo ploščico prekrili s folijo, jo 5 minut centrifugirali pri 2300 obratih/minuto in vstavili v PCR aparat.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|------|---|---|------|---|---|------|---|---|------|----|----|------|----|----|------|----|----|------|-----|----|------|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 |
| A | st1 | - | - | st2 | - | - | st3 | - | - | st4 | - | - | st5 | - | - | st6 | - | - | - | NTC | - | - | - | - |
| B | SB21 | - | - | SB22 | - | - | SB23 | - | - | SB25 | - | - | SB27 | - | - | SB28 | - | - | SB30 | - | - | SB33 | - | - |
| C | SB34 | - | - | SB37 | - | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Slika 6: Shema pipetiranja na ploščico s 384 vdolbinami za določitev referenčnega gena (prikazan je le del ploščice).

3.4.4. RAZVOJ METODE ZA DOLOČEVANJE IZRAŽANJA PREISKOVANIH GENOV

Preverjali smo izražanje sedmih genov, ki kodirajo različne antioksidativne encime, gene osi RANK, RANKL, OPG in VEGF-A v subhondralni kostnini. Zraven smo izmerili tudi izražanje dveh referenčnih genov, GAPDH in B2M.

Izvedba:

Iz izhodiščne cDNA (100 ng/μL) smo pripravili razredčene standarde: st1 (2,5 ng/μL), st2 (1,25 ng/μL), st3 (0,625 ng/μL), st4 (0,313 ng/μL), st5 (0,156 ng/μL) in st6 (0,078 ng/μL). Izmerili smo 13 genov: SOD2, TXNRD1, CAT, SEPP1, AOX1, PRDX5, RANKL, VEGFA, B2M, RANK, OPG, GSTP1, GAPDH. Pripravili smo reakcijsko zmes za qPCR, ki je vsebovala za gen GAPDH 100nM, za VEGF-A 300 nM in za ostale gene 600 nM koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov. V preglednicah VIII, IX in X so navedene količine in sestavine, ki so potrebne za pripravo reakcijske zmesi za qPCR.

Preglednica VIII: Priprava 100 nM reakcijske zmesi za vzorce subhondralne kostnine (za GAPDH).

| Koncentracija | 100 nM | |
|------------------------------|--------------|--------------|
| oligonukleotidnih začetnikov | | |
| Število vzorcev | 1 x | 96 x |
| Sestavine | Volumen (μL) | Volumen (μL) |
| Ultračista voda | 2,35 | 225,6 |
| F-oligonukleotidni začetnik | 0,075 | 7,2 |
| R-oligonukleotidni začetnik | 0,075 | 7,2 |
| SYBR Select MM 2x | 7,5 | 720 |
| cDNA | 5,0 | |
| Celotni volumen | 15 | |

Preglednica IX: Priprava 300 nM reakcijske zmesi za vzorce subhondralne kostnine (za VEGF-A).

| Koncentracija | | 300 nM |
|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| oligonukleotidnih začetnikov | | |
| Število vzorcev | 1 x | 96 x |
| Sestavine | Volumen (μL) | Volumen (μL) |
| Ultračista voda | 2,05 | 196,8 |
| F-oligonukleotidni začetnik | 0,225 | 21,6 |
| R-oligonukleotidni začetnik | 0,225 | 21,6 |
| SYBR Select MM 2x | 7,5 | 720 |
| cDNA | 5,0 | |
| Celotni volumen | 15 | |

Preglednica X: Priprava 600 nM reakcijske zmesi za vzorce subhondralne kostnine (za vse ostale).

| Koncentracija | | 600 nM |
|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| oligonukleotidnih začetnikov | | |
| Število vzorcev | 1 x | 96 x |
| Sestavine | Volumen (μL) | Volumen (μL) |
| Ultračista voda | 1,6 | 153,6 |
| F-oligonukleotidni začetnik | 0,45 | 43,2 |
| R-oligonukleotidni začetnik | 0,45 | 43,2 |
| SYBR Select MM 2x | 7,5 | 720 |
| cDNA | 5,0 | |
| Celotni volumen | 15 | |

Za vsak gen posebej smo najprej naredili standardno krivuljo. Na ploščico (s 384 vdolbinami) smo nanesti 10 μL reakcijske zmesi in nato 5 μL standardne raztopine različnih koncentracij v trojniku, standard 6 smo naredili v petih in NTC v štirih ponovitvah. Nato smo napipetirali 21 preiskovanih vzorcev po shemi, ki jo prikazuje slika 7. Vsak vzorec smo naredili v trojniku. Ploščico smo prekrili s folijo, centrifugirali in vstavili v PCR aparat, kjer smo zagotovili ustrezne pogoje potrebne za qPCR reakcijo, ki jih prikazujeta preglednici I in II.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 |
|---|------|---|---|------|---|---|------|---|---|------|----|----|------|----|----|------|----|----|------|----|-----|------|----|----|
| A | st1 | - | - | st2 | - | - | st3 | - | - | st4 | - | - | st5 | - | - | st6 | - | - | - | - | NTC | - | - | - |
| B | SB21 | - | - | SB22 | - | - | SB23 | - | - | SB25 | - | - | SB26 | - | - | SB27 | - | - | SB28 | - | - | SB30 | - | - |
| C | SB32 | - | - | SB33 | - | - | SB34 | - | - | SB35 | - | - | SB37 | - | - | SB38 | - | - | SB40 | - | - | SB42 | - | - |
| D | SB36 | - | - | SB44 | - | - | SB45 | - | - | SB47 | - | - | SB48 | - | - | | | | | | | | | |

Slika 7: Shema pipetiranja na 384 ploščico za določitev izražanja preiskovanih genov (prikazan je le del ploščice).

3.5. STATISTIČNE METODE

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili računalniški program SPSS/PASW v 18.0.0 (IBM, Chicago, IL, USA) in MS Excel 2010.

a) *Shapiro–Wilkov test normalne porazdelitve:*

S Shapiro-Wilkovim testom smo najprej preverili, ali se vse izmerjene vrednosti izražanja preiskovanih genov normalno porazdeljujejo. Ta test primerja vrednosti preučevane spremenljivke z vrednostmi, ki se normalno porazdeljujejo in imajo enako aritmetično sredino ter standardni odklon kot preučevana spremenljivka (61). S tem testom preverjamo ničelno hipotezo, da se vzorci porazdeljujejo normalno. Če je dobljena p vrednost večja od 0,05 ($p > 0,05$), se preučevane vrednosti porazdeljujejo normalno in tako v nadaljnji statistični obdelavi podatkov uporabimo parametrične teste. V primeru, da je p vrednost manjša od 0,05 ($p < 0,05$), se vrednosti ne porazdeljujejo normalno in uporabimo neparametrične teste (61). Lahko pa vrednosti ustrezno transformiramo, npr. logaritmiramo, in dobimo normalno porazdelitev.

V našem primeru so se vse izmerjene vrednosti za gene porazdeljevale normalno, saj smo dobili $p > 0,05$. V nadaljevanju smo tako uporabili Pearsonov koeficient korelacije, s katerim smo preverili povezavo med izražanjem genov antioksidativnih encimov in osjo RANK/RANKL/OPG.

b) *Pearsonov koeficient korelacije (r):*

S pomočjo Pearsonovega koeficienta korelacije smo preverili, ali sta določena gena X in Y med seboj linearno povezana. Vrednosti Pearsonovega koeficienta so na intervalu od -1 do $+1$. Ker nas zanima samo stopnja povezanosti, je vseeno kateri gen je v koordinatnem sistemu na abscisni in kateri na ordinatni osi. Na osnovi vrednosti in stopnje značilnosti

izračunanega koeficienta korelacije v vzorcu smo ugotavljali, kako je izražanje genov povezano med seboj. Postavili smo ničelno hipotezo (H_0), ki predpostavlja, da povezave ni in alternativno hipotezo (H_1), ki predpostavlja, da povezava je.

$H_0: \rho = 0$; povezave med geni ni.

$H_1: \rho \neq 0$; povezava med geni je.

Kritična vrednost je podana pri določeni stopnji značilnosti (0,05 ali 0,01) glede na določeno velikost vzorca.

V primeru, ko je izračunana vrednost koeficienta korelacije večja od kritične, ničelno hipotezo zavrnilo in potrdimo alternativno hipotezo. Ko pa je izračunan koeficient korelacije nižji od kritične vrednosti, ničelno hipotezo potrdimo (62). To analizo smo izvedli s pomočjo statističnega računalniškega programa SPSS in analize bivariatne korelacije, kjer je program izračunal Pearsonov koeficient, ki pove v kakšnem odnosu sta med seboj gena, ki smo ju primerjali. Program je podal tudi p vrednost, ki določa, ali je korelacija med dvema parametroma statistično značilna. Ko je $p < 0,05$ (vrednost r, označena z eno zvezdico) in $p < 0,01$ (vrednost r je označena z dvema zvezdicama v rezultatih SPSS), lahko potrdimo statistično značilno korelacijo med določenimi parametri, torej zavrnilo ničelno (H_0) in potrdimo alternativno hipotezo (H_1). V primeru velikega števila testiranih spremenljivk, v našem primeru genov, je treba p vrednost prilagoditi, saj je večja verjetnost naključno dobljenih statistično značilnih povezav (61). Za statistično značilne vrednosti smo upoštevali tako tiste, pri katerih je bila $p < 0,02$.

c) T-test:

Ker so se naše izmerjene vrednosti izražanja genov porazdeljevale normalno in smo imeli malo vzorcev, smo lahko uporabili t-test, s katerim smo med seboj primerjali povprečno izražanje posameznih genov (61). Zanimalo nas je, ali se geni glede na vrednosti povprečnega izražanja izražajo podobno ali obstajajo med njimi statistično značilne razlike. Če je bila izračunana p vrednost večja od 0,02, smo potrdili podobnost v izražanju med genskima paroma. V primeru, da je bil $p < 0,02$, pa smo sprejeli ničelno hipotezo, ki predpostavlja, da med izražanjem genskega para obstajajo statistično značilne razlike in podobnosti v izražanju med njima ni.

4. REZULTATI

4.1. NAČRTOVANJE OLIGONUKLEOTIDNIH ZAČETNIKOV

S pomočjo programa, dostopnega na internetni strani NCBI (angl. National Center for Biotechnology Information), Primer-BLAST (63), smo oblikovali oligonukleotidne začetnike, ki se prilegajo na gene za antioksidativne encime SOD2, SEPP1, CAT, TXNRD1, AOX1, GSTP1, PRDX5 in VEGF-A ter gene kostnih označevalcev RANKL, RANK, OPG. Potrebne podatke za mRNA, kot je oznaka NM, ki smo jih morali vnesti v Primer-BLAST, smo poiskali na internetni strani NCBI (64). Če se le da, načrtujemo takšne oligonukleotidne začetnike, da se prilegajo sami ali pomnožujejo odsek mRNA na stiku dveh eksonov. Tako se gDNA ne more pomnoževati, ampak se pomnožuje samo mRNA (cDNA) (65). Z ustreznim načrtovanjem oligonukleotidnih začetnikov se tako zmanjša možnost tvorbe dimerov (58).

Oligonukleotidno zaporedje teh genov je prikazano v preglednici XI. V PCR reakciji želimo preprečiti, da bi načrtovani oligonukleotidni začetniki tvorili homodimere, heterodimere ali sekundarne strukture. Ustreznost oligonukleotidnih začetnikov smo tako preverili s programom Oligo Analyzer (Integrated DNA Technologies) (66).

Preglednica XI: Nukleotidno zaporedje načrtovanih oligonukleotidnih začetnikov.

(*T_m* = talilna temperatura, *F*-začetnik = smerni oligonukleotidni začetnik, *R*-začetnik = protismerni oligonukleotidni začetnik)

| Gen | Začetnik | Zaporedje | T _m (°C) | Dolžina produkta |
|------------------------------|------------|-------------------------|---------------------|------------------|
| Antioksidantni encimi | | | | |
| SOD2 | F-začetnik | TGAAGTTCAATGGTGGTGGTCA | 60,1 | 91 |
| | R-začetnik | AGCAACTCCCCCTTGGGGTTC | 60,2 | |
| TXNRD1 | F-začetnik | AGGAACGCTCTCGGAATTGG | 60,1 | 107 |
| | R-začetnik | TGCCCTCCTGATAAGCCTTC | 59,2 | |
| CAT | F-začetnik | CTTTTTGCCTATCCTGACACTCA | 58,7 | 147 |
| | R-začetnik | ATTTGGAGCACCACCCTGATT | 59,9 | |
| SEPP1 | F-začetnik | TCTTGGTTTGCCTTTTTCTCTCC | 59,9 | 113 |
| | R-začetnik | CTTCATCTTTGAGAGTCGTGAGA | 57,9 | |
| AOX1 | F-začetnik | AAATAGACTGCCTGACGGGG | 59,5 | 107 |

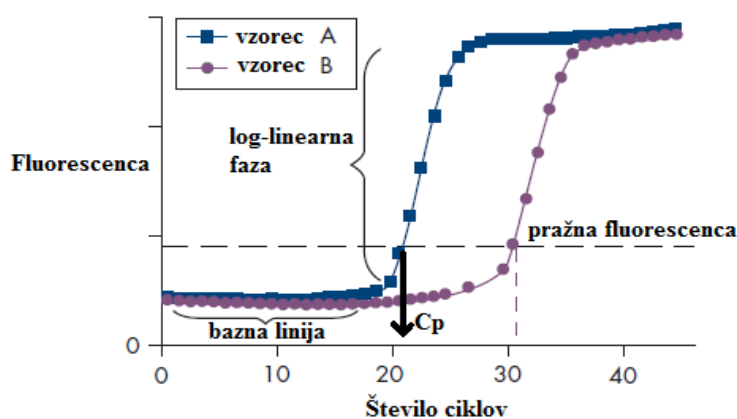
| | | | | |
|---------------------------|------------|----------------------------|------|-----|
| | R-začetnik | TGCACCTTCAATCTGGCCTA | 59,0 | |
| PRDX5 | F-začetnik | TTCAAGGGCAAGAAGGGTGTG | 60,7 | 76 |
| | R-začetnik | CTGGCAGGTGTGTCTTGGGAACA | 54,5 | |
| GSTP1 | F-začetnik | TATTTCCCAGTTCGAGGCCG | 59,8 | 126 |
| | R-začetnik | TAGGCAGGAGGCTTTGAGTG | 59,4 | |
| VEGF-A | F-začetnik | AGCCTTGCCTTGCTGCTCTACC | 65,1 | 84 |
| | R-začetnik | GTGATGATTCTGCCCTCCTCCTTC | 62,8 | |
| Kostni označevalci | | | | |
| RANKL | F-začetnik | TGATTCATGTAGGAGAATTAACAGG | 57,3 | 82 |
| | R-začetnik | GATGTGCTGTGATCCAACGA | 58,3 | |
| RANK | F-začetnik | GCAGGTGGCTTTGCAGAT | 58,3 | 109 |
| | R-začetnik | GCATTTAGAAGACATGTACTTTCCTG | 58,5 | |
| OPG | F-začetnik | GAAGGGCGCTACCTTGAGAT | 59,5 | 102 |
| | R-začetnik | GCAAACGTATTTCGCTCTGG | 57,9 | |

4.2. ANALIZA REZULTATOV qPCR

Rezultat PCR reakcije je sigmoidna krivulja (slika 8), ki prikazuje pomnoževanje PCR produkta in podaja fluorescenco v odvisnosti od števila ciklov (55).

V tej nalogi smo uporabili relativno kvantifikacijo, saj smo C_p standardov z znano koncentracijo cDNA primerjali s C_p preiskovanih vzorcev z neznano koncentracijo. Bolj kot absolutno število kopij cDNA so nas zanimala razmerja v izražanju preiskovanih genov. Po končani PCR reakciji smo s pomočjo metode maksimuma 2. odvoda v programu LC480 določili C_p vsem standardom in vsem vzorcem. Program je tudi izrisal premico na grafu, kjer os y predstavlja C_p , os x pa desetiške logaritemske koncentracije standardov. Najprej smo pogledali naklon te premice, ki mora znašati od -3,1 do -3,6, kar ustreza 90 – 110 % učinkovitosti qPCR. Naklon standardne krivulje za idealno qPCR reakcijo je -3,3, kar pomeni učinkovitost 2 oz. natančno podvojitev tarčne DNA v vsakem ciklu. Koeficient korelacije r^2 mora biti čim bližje 1 in nakazuje dobro linearno povezanost za posamezne standarde. Glede na standardno krivuljo in C_p preiskovanih vzorcev program izračuna koncentracijo v naših preiskovanih vzorcih. Standardna deviacija mora biti med ponovitvami oz. replikati preiskovanih vzorcev čim nižja. Zato je pomembno, da delamo čim več ponovitev, toliko, kot si jih lahko privoščimo glede na količino dragocenega vzorca. Za vsak gen posebej določimo mejo sprejemljive SD. Standardna deviacija je odvisna od stopnje izražanja gena. Pri slabše izraženih genih so SD veliko večje kot npr.

pri referenčnih genih, ki se dobro izražajo. V poizkusu optimizacije smo izbrali mejo $SD < 0,5$. Nato smo naredili še analizo talilne krivulje, kjer program izračuna talilno temperaturo s pomočjo odvoda fluorescenc po temperaturi ($-d\text{fluorescence}/dT$). Med spremljanjem talilne temperature je pomembno, da nastanejo piki pri enaki T_m , saj lahko tako izključimo prisotnost dimerov, kontaminacijo, pomnoževanje genomske DNA ali prisotnost drugih nespecifičnih produktov PCR (58). Talilna temperatura je odvisna od dolžine produkta PCR reakcije in vsebnosti GC parov, vsi produkti PCR za naše gene imajo T_m višjo od 60°C .



Slika 8: Fluorescenčna krivulja pomnoževanja PCR produkta, ki jo dobimo po končani PCR reakciji. Slika prikazuje krivulji dveh vzorcev (A in B). Vzorec A vsebuje večjo količino oligonukleotidnih začetnikov kot vzorec B. (C_p = točka prehoda, angl. *crossing point*). (Prirejeno po 55).

4.2.1. OPTIMIZACIJA KONCENTRACIJE OLIGONUKLEOTIDNIH ZAČETNIKOV

Z optimizacijo qPCR reakcije določimo koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov, vrednost C_p za območje standardnih raztopin, ki nam pove kakšno redčitev vzorcev moramo pripraviti, in program qPCR reakcije, ki ima lahko ločeni ali združeni fazi prileganja in pomnoževanja.

Optimizirali smo koncentracije oligonukleotidnih začetnikov za izbrane gene: COL1A1, SOD2, MMP1, SEPP1, AOX1, GSTP1, PRDX5, ACTB, TBP, B2M, GAPDH, VEGF-A, RANKL, RANK, OPG, CAT in TXNRD1. Dobljeni rezultati optimizacije genov so prikazani v preglednici XII.

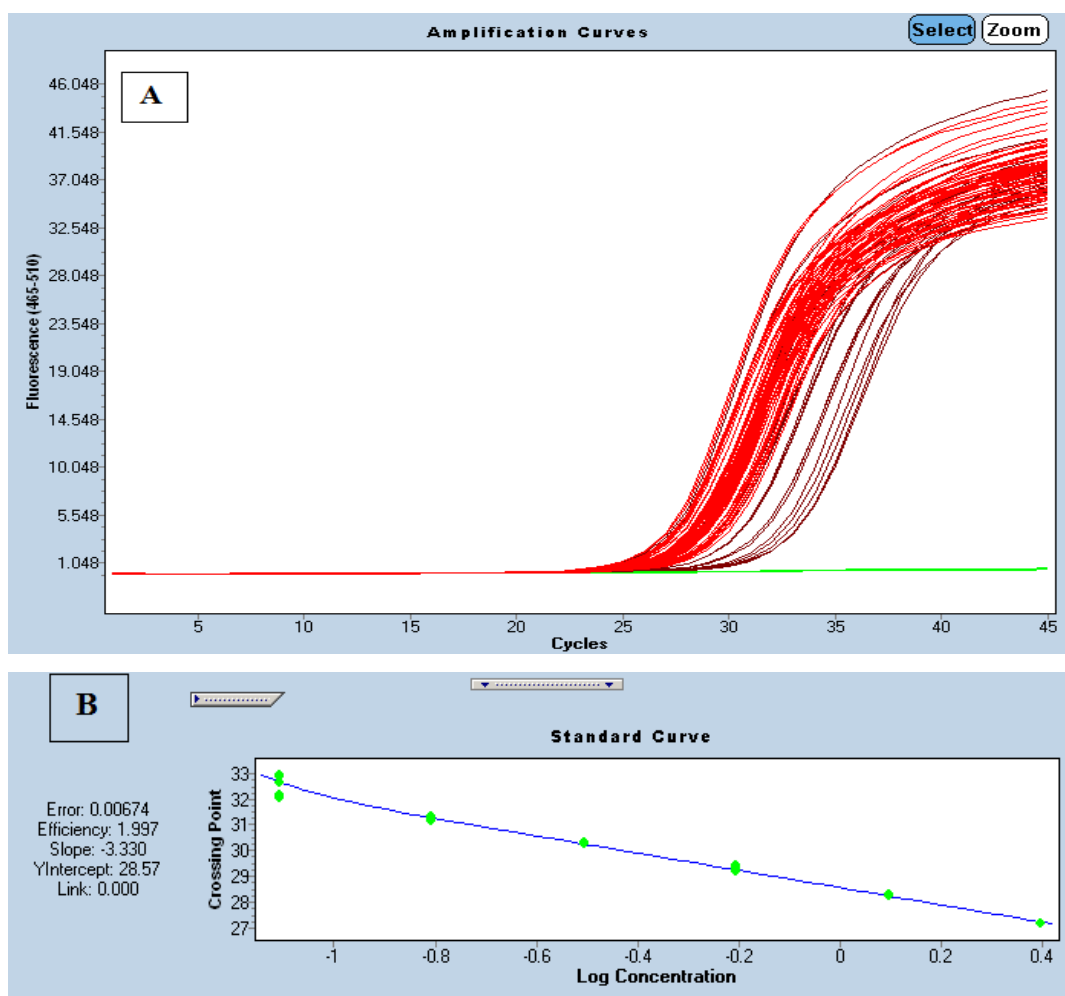
Preglednica XII: Rezultati optimizacije genov. (*E* = učinkovitost, *C_p* = točka prehoda, *NTC* = slepa kontrola, *T_m* = talilna temperatura, brez *RT* = brez encima reverzna transkriptaza)

| Gen | Naklon standardne krivulje | E | C _p za St 5ng/μL | C _p za st 0,156 ng/μL | NTC | T _m | Brez RT | C _p za 600nM oligonukleotidne začetnike |
|--------|----------------------------|------|-----------------------------|----------------------------------|-------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------------|
| SOD2 | -3,7 | 1,9 | 23,5 | 28,8 | neg | 1 pik | neg | 24,5 |
| TXNRD1 | -3,8 | 1,8 | 25,7 | 31,5 | neg | 1 pik | neg | 27 |
| CAT | -3,7 | 1,9 | 23,4 | 24,7 | neg | 1 pik | neg | 24,7 |
| SEPP1 | -3,6 | 1,9 | 22,6 | 27,98 | neg | 1 pik | neg | 23,5 |
| AOX1 | -3,5 | 1,94 | 29 | 33,5 | neg | 1 pik | neg | 30 |
| GSTP1 | -4,4 | 1,7 | 29.5(600nM) | 36 | neg | 1 pik | neg | 34,2 |
| PRDX5 | -3,9 | 1,8 | 24 | 30 | neg | 1 pik | neg | 26 |
| TBP | -3,7 | 1,9 | 28,6 | 34,8 | neg | 1 pik | 40cp, majhen pik | 30 |
| B2M | -3,5 | 1,9 | 20,8 | 26,2 | 40 in 37cp | 1 pik | brez RT drug pik kot cDNA | 23 |
| ACTB | -4,4 | 1,7 | 18,9 | 24,7 | neg in 40cp | 1 pik | 7 cp za st2, drug pik kot cDNA | 21,6 |
| GUSB | -3,4 | 1,97 | 27,7 | 33,3 | neg | 1 pik | isti pik kot cDNA; 12cp za st 2 | 33 |
| VEGFA | -3,3 | 2 | 26,7 | 32 | neg | 1 pik | neg | 31,8 |
| RANK | -4,9 | 1,6 | 32 | 36,7 | neg | 1 pik | neg | 32,5 |
| RANKL | -4,1 | 1,8 | 29 | 34 | neg | 1 pik | neg | 29,8 |
| OPG | -3,5 | 1,9 | 28,2 | 33,8 | neg | 1 pik | neg | 29,2 |
| GAPDH | -3,5 | 1,95 | 20,6 | 25,8 | neg | 1 pik, pri 600nm koleno na levi | 7 cp za st2, drug pik kot cDNA | 25.6(st6) |
| RPLP0 | predhodno optimiziran | | | | | | | |

Podatke, pridobljene s qPCR, smo analizirali z uporabo programa LightCycler 480 in metodo maksimuma drugega odvoda fluorescenčne krivulje (2nd Derivative maximum method, LightCycler 480 software) za vsak gen posebej. Z uporabo te metode dobimo *C_p*, ki je cikel, pri katerem vzorec preide pražno fluorescenco (61). Iz *C_p* vzorcev s standardno raztopino smo dobili standardno krivuljo, ki jo opisuje enačba 6 in prikazuje slika 9B. Z optimizacijo smo preverili, v kateri koncentraciji (100 nM, 600 nM ali 1000 nM) dobimo specifičen PCR produkt. Če so bili *C_p* pri 100 in 600 nM koncentracijah enaki, smo izbrali

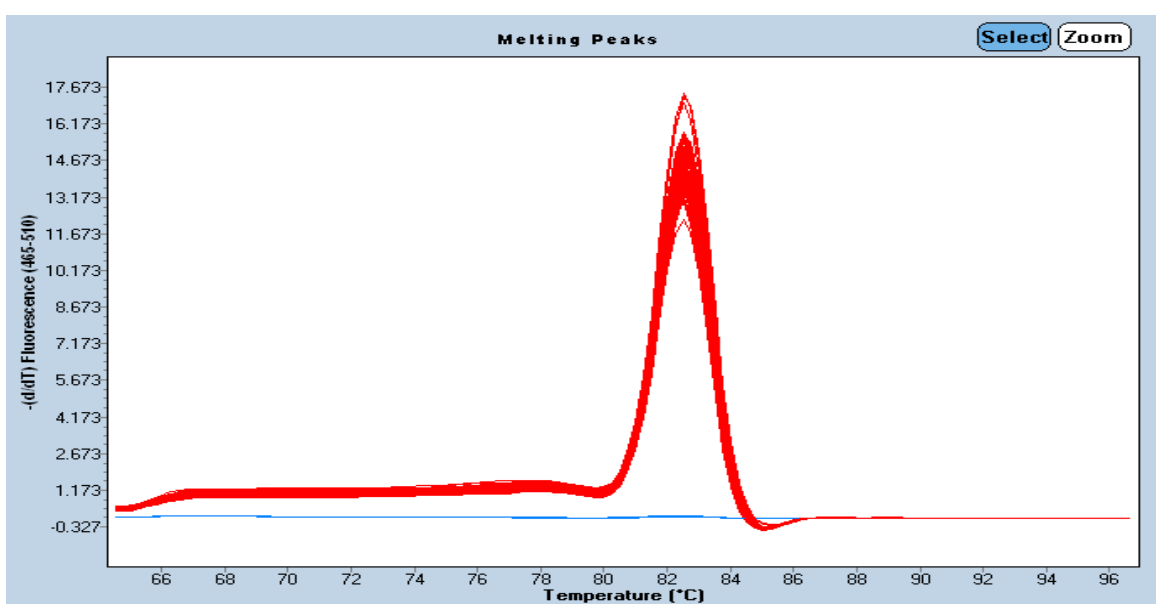
nižjo koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov. Z negativnim rezultatom pri vzorcu (SB29-RT), ki ne vsebuje cDNA, smo dokazali odsotnost pomnoževanja gDNA. Tudi NTC je morala biti negativna. Če dobimo pri NTC dodaten signal, pomeni, da je prisoten nespecifičen produkt, npr. dimer, ki sta ga tvorila oligonukleotidna začetnika, ali pa je bila naša PCR reakcijska zmes kontaminirana s tujim vzorcem iz prejšnjih poskusov. Prisotni dimeri zmanjšajo učinkovitost qPCR, zlasti če uporabljamo tehnologijo SYBR Green I (60). Dimeri bolj pogosto nastajajo v NTC, ker ni prisotne cDNA, kamor bi se vezala (58). S pomočjo standardne krivulje, ki jo prikazuje slika 9, smo za vsak gen preverili učinkovitost qPCR, ki je morala biti med 1,8 in 2,2 (58).

$$\text{Log}(C) = -3,330 C_p + 28,57 \text{ (enačba 6)}$$

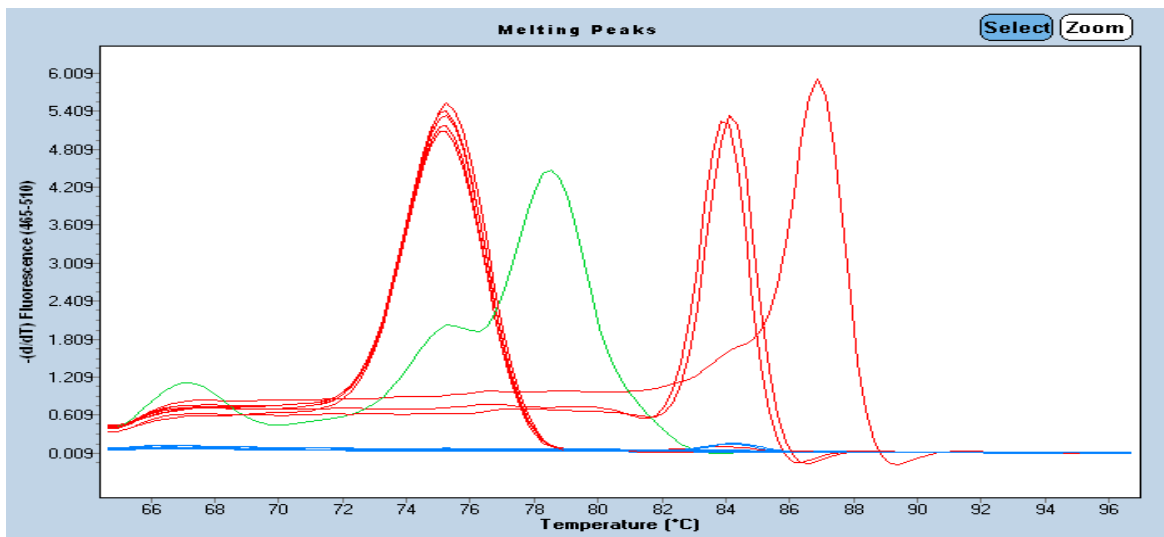


Slika 9: Rezultati uspešne reakcije qPCR. A- Krivulja pomnoževanja podaja odvisnost logaritemske vrednosti koncentracije standardnih vzorcev od števila ciklov qPCR. B- Iz naklona standardne krivulje dobimo podatke o učinkovitosti qPCR.

Za vsak preiskovani gen smo opazovali tudi talilno krivuljo, ki je določena s talilno temperaturo (T_m , angl. melting temperature), pomnoženega amplikona v qPCR reakciji. Pri tej analizi je pomembno, da zaznamo nastanek le enega specifičnega produkta po koncu qPCR (slika 10). Dodaten signal, ki ima T_m nižjo od primarnega, nas opozori na prisotnost nespecifičnega produkta, npr. dimera ali kontaminacije (slika 11) (58). Zelo pomembno je, da v vzorcu, ki ne vsebuje encima reverzne transkriptaze (RT), ne dobimo iste talilne krivulje kot pri preiskovanih vzorcih cDNA. Če sta bili standardna krivulja in talilna krivulja nekega gena neustrezni, smo načrtovali in naročili druge oligonukleotidne začetnike oz. ta gen izključili iz nadaljnje analize.



Slika 10: Talilna krivulja uspešne optimizacije oligonukleotidnih začetnikov. Prisoten je samo en vrh s T_m okoli 82°C, ki pripada zelenemu produktu qPCR.



Slika 11: Talilna krivulja pri neuspešno optimizirani qPCR. Krivulja prikazuje prisotnost nespecifičnih produktov. Na grafu je več vrhov, ki ne pripadajo zelenemu produktu qPCR. Sklepamo lahko na primer-dimer, ki ga tvorita začetna oligonukleotida, pomnoževanje gDNA, nespecifičnost oligonukleotidnih začetnikov, ki se prilegajo tudi na druga mesta v cDNA ali na kontaminacijo z drugimi vzorci.

Najboljše rezultate qPCR za gene: SOD2, TXNRD1, CAT, SEPP1, AOX1, GSTP1, PRDX5, VEGF-A, RANK, RANKL in OPG smo dobili pri koncentraciji oligonukleotidnih začetnikov 600 nM. Za te gene je bila prav tako ustrezna tudi talilna krivulja, ki je podala le en specifičen signal. Vzorca brez RT in NTC pa sta bila popolnoma negativna v vseh ponovitvah. qPCR reakcije za gene: COL1A1 in MMP1 nismo uspeli zoptimizirati z danimi pari oligonukleotidnih začetnikov. Pri vzorcu brez reverzne transkriptaze smo dobili iste signale kot pri vzorcih cDNA, kar pomeni pomnoževanje genomske DNA in s tem neustrezno določitev izražanja genov. Učinkovitost reakcije je tudi manjša, saj gDNA in mRNA tekmujeta za reakcijske komponente, kot so dNTP in oligonukleotidni začetniki. Najboljši način za preprečitev motnje gDNA pri qPCR je premišljeno oblikovanje oligonukleotidnih začetnikov na spoju dveh eksonov, ki upošteva prisotnost intronov v gDNA, v mRNA pa niso prisotni, in tako se oligonukleotidni začetniki prilegajo le na cDNA (58). Za analizo teh dveh genov bi bilo treba ponovno načrtovati in sintetizirati oligonukleotidne začetnike, zato smo ju izključili iz nadaljnje analize.

4.2.2. DOLOČITEV REFERENČNIH GENOV

Pred določitvijo izražanja preiskovanih genov smo določili najboljši par referenčnih genov. Referenčni ali hišni geni se ne glede na vplive izražajo enako, so konstantno regulirani. V določenih pogojih glede na zunanje ali notranje vplive pa njihovo izražanje ni stabilno, zato je bilo potrebno za vsak poskus posebej določiti najbolj stabilen referenčni gen. V študijah izražanja genov smo primerjali preiskovane gene med dvema neodvisnima populacijama. Pri tem pa smo morali uporabiti notranje kontrole ali referenčne gene, s pomočjo katerih smo rezultate normalizirali in jih primerjali med seboj. Za določitev najprimernejšega referenčnega gena smo uporabili set najpogosteje uporabljenih endogenih kontrol (54). Relativna primerjava genske ekspresije je najboljša, kadar je nivo izbranega hišnega gena konstanten in je približno enak nivoju izražanja preiskovanega gena (58). S pomočjo programa NormFinder (67) (preglednica XIII) smo določili referenčna gena, ki se najbolj konstantno izražata med skupinama 10 vzorcev z visokim in nizkim deležem subhondralne kosntnine (58).

Preglednica XIII: Rezultati izražanja 10 kandidatnih genov za določitev najboljšega referenčnega gena.

| Gen | Razlike znotraj skupine | | Razlike med skupinami | |
|-------|-------------------------|-------|-----------------------|--------|
| | 0 | 1 | 0 | 1 |
| ACTB | 0,257 | 0,212 | 0,028 | -0,028 |
| GUSB | 0,195 | 0,109 | 0,121 | -0,121 |
| B2M | 0,142 | 0,153 | -0,155 | 0,155 |
| TBP | 0,195 | 0,109 | 0,121 | -0,121 |
| GAPDH | 0,098 | 0,126 | -0,083 | 0,083 |
| RPLP0 | 0,465 | 0,171 | -0,033 | 0,033 |

Vrednost dejavnika stabilnosti = 0,149

Vrednost dejavnika stabilnosti dveh najboljših referenčnih genov (B2M in GAPDH) = 0,114

Program je najprej podal stabilnost posameznega referenčnega gena. Nižja kot je bila izračunana vrednost stabilnosti, manjša je variabilnost v izražanju tega gena med preiskovanimi vzorci in bolj stabilen je gen. Program je izračunal tudi variabilnost znotraj posamezne skupine (npr. kontrola in bolni) in variabilnost izražanja posameznega referenčnega gena med posameznimi skupinami vzorcev (npr. kontrola in bolni). V našem

primeru je bila kontrolna skupina označena z 0 in je predstavljala kosti z višjim deležem kostnine, skupina označena z 1 pa je predstavljala vzorce z nižjim deležem kostnine. Od vseh genov se je najbolj stabilno izražal gen GAPDH. Najboljša kombinacija dveh referenčnih genov pa je bila B2M in GAPDH. Ta dva gena oz. njuno geometrično sredino smo uporabili v nadaljnjem eksperimentu za normalizacijo izražanja preiskovanih genov.

4.2.3. DOLOČANJE IZRAŽANJA PREISKOVANIH GENOV

Z metodo qPCR smo na 21 vzorcih izmerili izražanje genov SOD2, TXNRD1, CAT, SEPP1, AOX1, GSTP1, PRDX5, VEGF-A, RANKL, RANK in OPG v subhondralni kostnini. Zaporedje oligonukleotidnih začetnikov je predstavljeno v preglednici XI.

S pomočjo qPCR smo uspešno izmerili izražanje vseh zgoraj omenjenih genov, pri katerih smo dobili standardno krivuljo z ustreznim naklonom (učinkovitostjo qPCR), kot jo prikazuje slika 9, in specifično talilno krivuljo, kot je prikazana na sliki 10.

Koncentracije genov SOD2, TXNRD1, CAT, SEPP1, AOX1, GSTP1, PRDX5, VEGF-A, RANKL, RANK in OPG smo normalizirali glede na geometrično sredino dobljenih koncentracij referenčnih genov (B2M in GAPDH). Dobljene rezultate smo nato statistično obdelali.

4.3. STATISTIČNA ANALIZA

4.3.1. PREISKOVANA SKUPINA

V raziskavo smo vključili vzorce subhondralne kostnine 24 preiskovancev, od tega je bilo 20 moških in 4 ženske. Osnovni antropometrični podatki za preiskovano skupino so podani v preglednici XIV. Preiskovanci so bili stari med 38 in 87 let in visoki od 1,60 do 1,88 m. Najlažja oseba je tehtala 55 kg, najtežja pa 105 kg.

Preglednica XIV: Opis preiskovane skupine. (*ITM = indeks telesne mase, SD = standardna deviacija*)

| | N | Povprečna vrednost ± SD |
|-------------------------------|----------|--------------------------------|
| Starost (leta) | 24 | 68,9 ± 12,3 |
| Telesna višina (m) | 24 | 1,73 ± 0,1 |
| Telesna teža (kg) | 24 | 78,8 ± 13,2 |
| ITM (kg/m²) | 24 | 26,2 ± 3,7 |

S pomočjo Pearsonovega koeficienta korelacije smo ugotavljali, ali je izražanje antioksidativnih encimov in označevalec angiogeneze VEGF-A v linearni povezavi z izražanjem genov osi RANK/RANKL/OPG. Statistično značilne povezave smo dobili za antioksidativne encime SOD2, TXNRD1, CAT, SEPP1 in VEGF-A.

4.3.2. IZRAŽANJE GENOV ZA RANK, RANKL IN OPG

V preglednici XV so navedene srednje vrednosti (povprečna vrednost \pm SD) izražanja genov za RANK, RANKL in OPG, v preglednici XVI pa srednje vrednosti izražanja genov za antioksidativne encime. Glede na povprečne vrednosti izražanja genov RANK, RANKL, OPG, vidimo, da je izražanje OPG občutno višje kot RANKL in RANK.

Preglednica XV: Srednje vrednosti izražanja za gene RANK, RANKL, OPG. (*SD = standardna deviacija*)

| Gen | Povprečna vrednost (ng/μL) \pm SD |
|------------|----------------------------------------------------------------------|
| RANK | 2,90 \pm 2,49 |
| RANKL | 2,02 \pm 1,88 |
| OPG | 6,78 \pm 8,78 |

Preglednica XVI: Srednje vrednosti izražanja genov za antioksidativne encime. (*SD = standardna deviacija*)

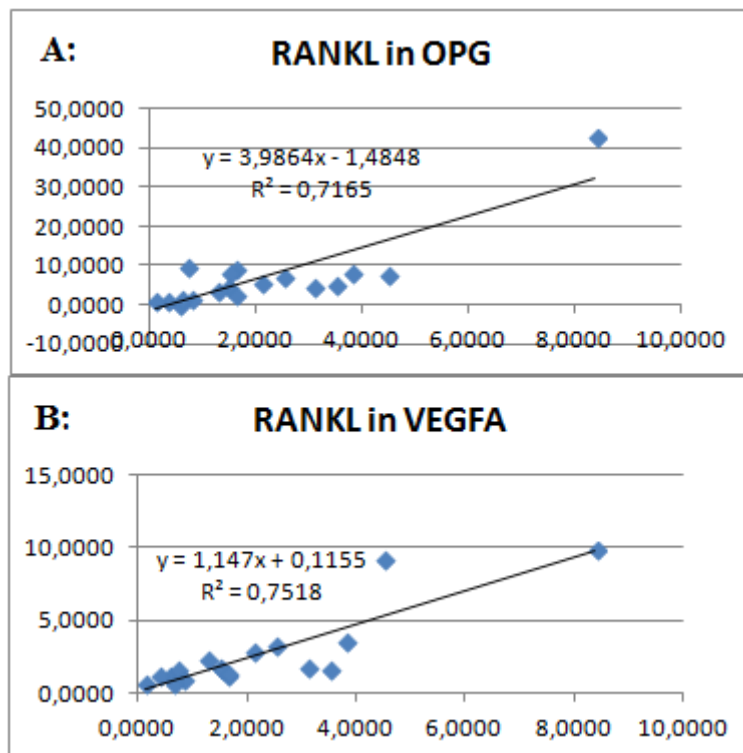
| Gen | Povprečna vrednost (ng/μL) \pm SD |
|------------|----------------------------------------------------------------------|
| SOD2 | 1,06 \pm 0,77 |
| TXNRD1 | 1,19 \pm 0,46 |
| CAT | 1,57 \pm 1,26 |
| SEPP1 | 3,32 \pm 1,52 |
| AOX1 | 0,99 \pm 0,45 |
| PRDX5 | 0,79 \pm 0,25 |
| GSTP1 | 1,20 \pm 0,56 |
| VEGF-A | 2,45 \pm 2,46 |

4.3.3. KORELACIJA ANTIOKSIDATIVNIH ENCIMOV Z RANKL

Preglednica XVII: Vrednosti Pearsonovega koeficienta korelacije za gene, ki so bili signifikantno povezani z RANKL. (N = število preiskovancev, r = Pearsonov koeficient korelacije, p = stopnja značilnosti)

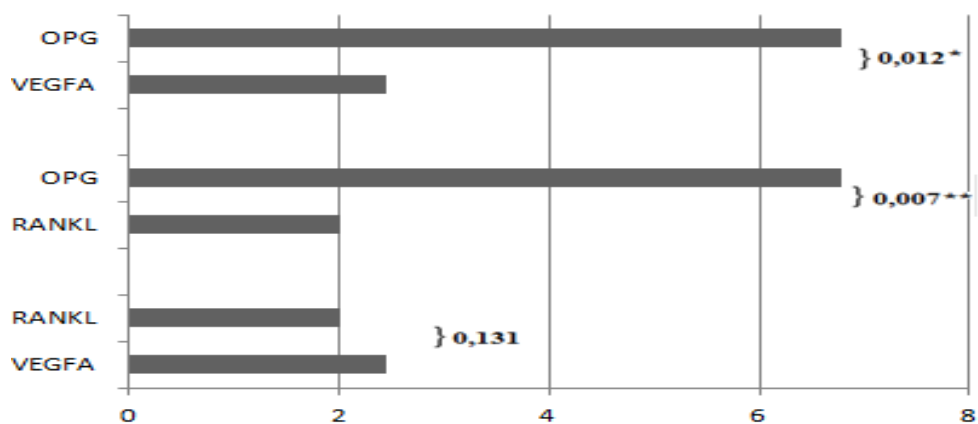
| Gen | r | p |
|--------|-------|---------|
| VEGF-A | 0,867 | < 0,001 |
| OPG | 0,833 | < 0,001 |

Ker se pri VEGF-A ($r = 0,867$) in OPG ($r = 0,833$) vrednosti Pearsonovega koeficienta korelacije približujeta vrednosti števila 1 in je vrednost $p < 0,001$, obstaja statistično značilna močna pozitivna povezava med VEGF-A in RANKL ter OPG in RANKL. To pomeni, če se poveča vrednost VEGF-A ali OPG, se poveča tudi vrednost RANKL ter obratno. Statistično značilno korelacijo med VEGF-A in RANKL ter OPG in RANKL lahko prikažemo s spodnjima grafoma in opišemo z enačbama linearne regresije. Kvadrat Pearsonovega koeficienta nam pove, kolikšen delež variacije v izražanju VEGF-A ali OPG lahko razložimo z izražanjem RANKL.



Slika 12: Povezanost med izražanjem genov. A- za RANKL in OPG, B- za RANKL in VEGF-A.

S t-testom pa smo preverili ali obstajajo statistično značilne razlike med povprečnim izražanjem genov za RANKL, OPG in VEGF-A (slika 13).



Slika 13: Povprečne vrednosti izražanja za genske pare RANKL, OPG in VEGF-A. Statistično značilne razlike, dobljene s t-testom so označene z * (* $p < 0.02$, ** $p < 0.01$).

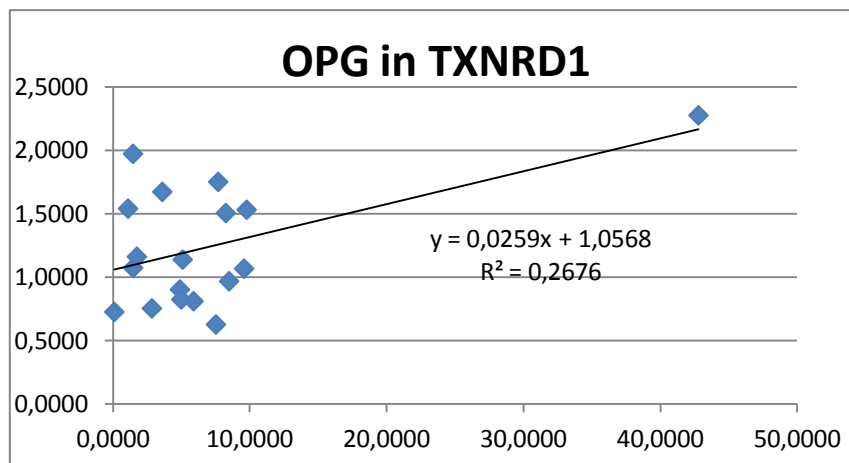
Med izražanjem genov VEGF-A in RANKL ni statistično značilne razlike, med paroma RANKL – OPG in VEGF-A – OPG pa obstaja statistično značilna razlika. OPG se statistično značilno veliko bolj izraža v subhondralni kosti naših preiskovancev kot RANKL in VEGF-A.

4.3.4. KORELACIJA ANTIOKSIDATIVNIH ENCIMOV Z OPG

Preglednica XVIII: Vrednosti Pearsonove korelacije za gene, ki so pokazali statistično značilne povezave z izražanjem OPG. ($r =$ Pearsonov koeficient korelacije, * $< 0,02$)

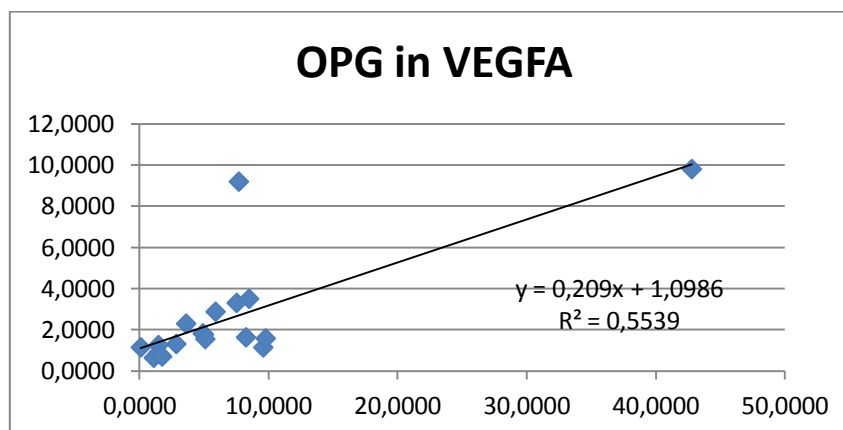
| Gen | r | p |
|--------|-------|---------|
| TXNRD1 | 0,504 | 0,020 |
| VEGF-A | 0,743 | 0,0001* |

V naši študiji smo dokazali mejno statistično značilno pozitivno povezavo med TXNRD1 in OPG (slika 14).



Slika 14: Povezanost med izražanjem genov OPG in TXNRD1.

Naši rezultati so pokazali statistično značilno pozitivno povezavo tudi med izražanjem genov za VEGF-A in OPG (slika 15).



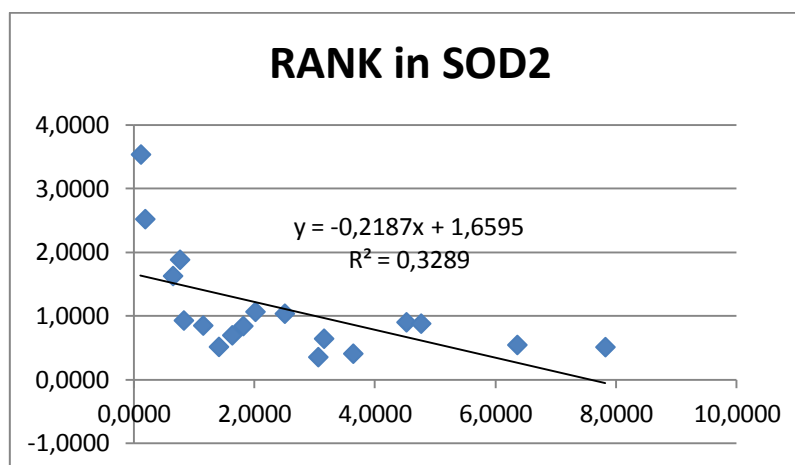
Slika 15: Povezanost med izražanjem genov OPG in VEGF-A.

4.3.5. KORELACIJA ANTIOKSIDATIVNIH ENCIMOV Z RANK

Preglednica XIX: Vrednosti Pearsonovega koeficienta korelacije za gene, ki so bili statistično značilno povezani z RANK. (r = Pearsonov koeficient korelacije, * < 0,02)

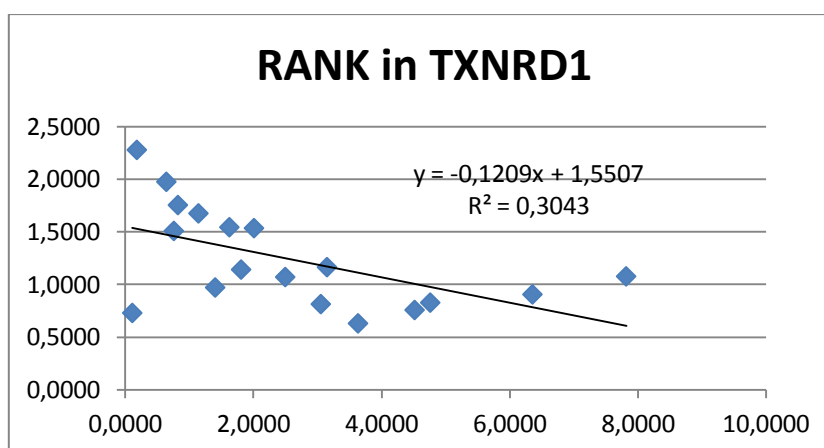
| Gen | r | p |
|--------|--------|---------|
| SOD2 | -0,548 | 0,010* |
| TXNRD1 | -0,494 | 0,023 |
| CAT | -0,565 | 0,008* |
| SEPP1 | 0,808 | 0,0001* |

V korelacijski analizi smo dobili statistično negativno, srednje močno korelacijo med genom RANK in SOD2. Če se izražanje gena SOD2 zmanjša, se bo izražanje gena za RANK povečalo, in obratno (slika 16).



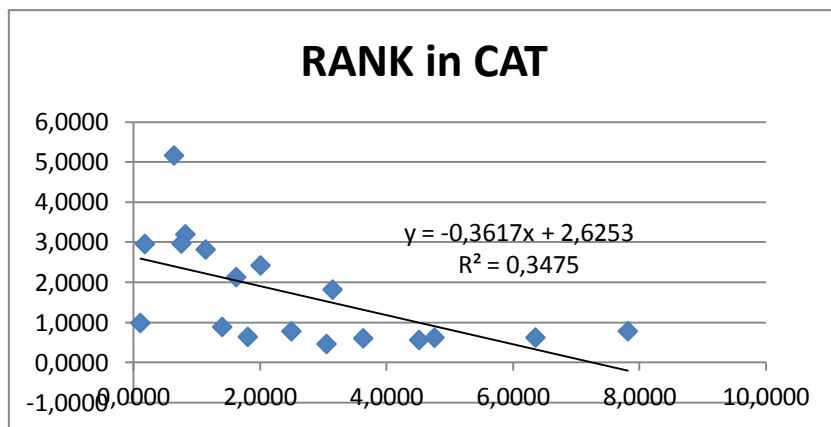
Slika 16: Povezanost med izražanje genov za SOD2 in RANK v vzorcih subhondralne kosti.

Antioksidativni encim TXNRD1 je bil mejno statistično značilno negativno povezan z izražanjem gena za RANK (slika 17). Da bi se lahko prepričali o dejanski statistično značilni povezavi, bi morali merjenje izražanja gena za TXNRD1 izvesti na večjem številu vzorcev.



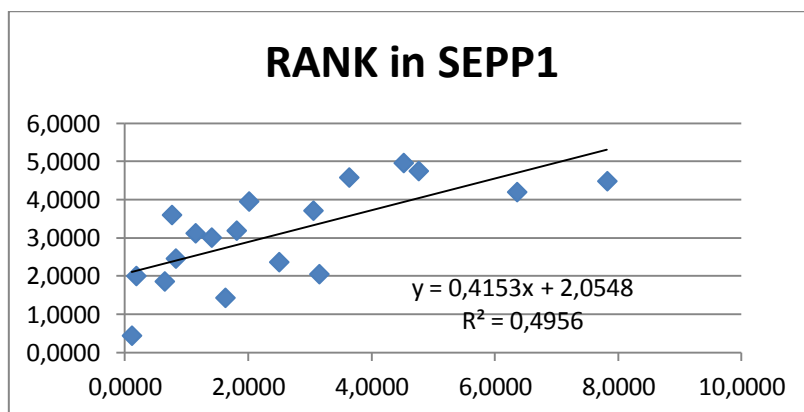
Slika 17: Povezanost med izražanjem genov za TXNRD1 in RANK v vzorcih subhondralne kosti.

Statistično značilno negativno povezavo smo dobili tudi med izražanjem gena za CAT in RANK (slika 18).



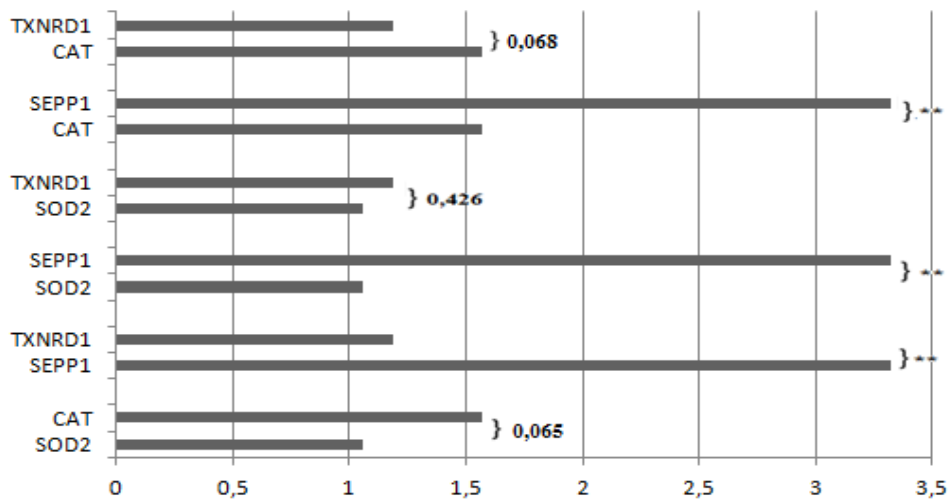
Slika 18: Linearna regresija med izražanjem gena za CAT in gena za RANK v vzorcih subhondralne kostnine.

Tudi med izražanjem genov za SEPP1 in RANK smo ugotovili statistično značilno pozitivno povezavo, kar pomeni, da ko se izražanje gena za RANK poveča, se poveča tudi izražanje gena za SEPP1 (slika 19).



Slika 19: Pozitivna korelacija v vzorcih subhondralne kostnine med izražanjem genov za RANK in SEPP1.

Pri uporabi t-testa smo statistično značilne razlike v izražanju genov dobili za pare SEPP1–TXNRD1, SOD2 – SEPP1 in CAT – SEPP1 (slika 20). Gen za SEPP1 se od vseh treh genov, katere smo z njim primerjali, izraža statistično značilno drugače. Za SOD2, CAT in TXNRD1 ne velja statistično značilna razlika izražanja, saj je njihovo povprečno izražanje zelo podobno.



Slika 20: Razlike med povprečnimi vrednostmi izražanja za genske pare SOD2, TXNRD1, CAT in SEPP1. Z * so označene statistično značilne razlike, ki smo jih dobili s *t*-testom (* $p < 0.02$, ** $p < 0.01$).

5. RAZPRAVA

5.1. PREISKOVANA SKUPINA

Med preiskovanci so prevladovali moški, za katere je značilno, da se pri njih simptomi OA pojavijo nekoliko prej kot pri ženskah, okoli 45. leta (13). Vzrok za to bi lahko bila genska predispozicija ali večja ponavljajoča se sklepna obremenitev (npr. težko fizično delo). Povprečna starost preiskovancev v naši študiji je bila več kot 69 let. Značilno je, da z leti hrustanec izgublja sposobnost obnove (13), zato se pojavijo s starostjo povezane degenerativne spremembe sklepov. Na podlagi povprečnega indeksa telesne mase, ki je bil višji od 26, lahko sklepamo, na vpliv prekomerne telesne teže na večjo obremenitev nosilnih sklepov (13). Glede na osnovne podatke o preiskovancih, ki so nam bili na voljo, torej visoke povprečne starosti in ITM, bi lahko pri nekaterih osebkih sklepali na degenerativno poškodbo sklepov, čeprav nobeden od njih ni imel podatka o prisotnosti degenerativnih boleznih sklepov v svoji anamnezi.

5.2. IZRAŽANJE GENOV ZA RANK, RANKL IN OPG V SUBHONDRAJNI KOSTNI PRI OSTEOARTROZI

Na podlagi raziskave, ki jo je opravil Kwan Tat s sod., lahko trdimo, da porušenje ravnovesja med izražanjem genov za RANK, RANKL in OPG v subhondralni kosti vodi v razvoj kostnih bolezni, npr. OA. V osteoartroznom tkivu je izražanje genov za RANK in RANKL nekoliko nižje kot pri osteoporozi, izražanje OPG pa višje (68). Če se osredotočimo samo na povprečne vrednosti izražanja genov za RANK, RANKL in OPG, vidimo, da je izražanje OPG ($6,78 \pm 8,78$) občutno višje kot RANKL ($2,02 \pm 1,88$) in RANK ($2,90 \pm 2,49$). OPG, ki se je povišano izražal v naših vzorcih, je nevtraliziral učinke RANKL in tako preprečil pospešeno kostno resorpcijo.

5.3. POVEZANOST MED IZRAŽANJEM GENOV ZA VEGF-A IN OPG Z RANKL

RANKL se izraža v osteoblastih, veže se lahko na RANK ali OPG. Vezava na RANK sproži osteoklastogenezo in resorpcijo kosti, vezava OPG na RANKL pa to prepreči (9). VEGF-A se izraža v osteoblastih. Vključen je v vnetni proces in angiogenezo, njegovo izražanje pa se sproži pri mehnični obremenitvi vertebralnih diskov (69). Inducira

osteoklastogenezo, tako da vpliva na povečano izražanje genov za RANKL, kar stimulira delovanje osteoklastov in spodbudi kostno resorpcijo (22). OPG preprečuje vezavo RANKL s svojim receptorjem RANK in tako ščiti kosti pred razgradnjo. OPG in RANKL sta primarna regulatorja resorpcije kosti, zato razmerje OPG/RANKL odraža osteoklastno dejavnost (70). Pri normalni, fiziološki remodelaciji kosti sta OPG in RANKL v določenem ravnovesju. Kadar določeni dejavniki stimulirajo izražanje RANKL, se veže na receptor RANK, ki sproži osteoklastogenezo in razgradnjo kostnine. Pri tem se poveča izražanje gena OPG, ki se nato veže na RANKL ter tako zavre nadaljnjo interakcijo RANKL z RANK. Ko je v sklepu prisotno vnetje, kot npr. pri RA, je izražanje OPG prav tako zmanjšano (71). Ker sta procesa kostne razgradnje in izgradnje sklopljena, naj bi zvišanemu izražanju RANKL sledilo tudi zvišano izražanje OPG, kar smo v naši študiji dokazali tudi s statistično značilno pozitivno korelacijo med tema dvema genoma.

Predvideva se, da bi VEGF-A lahko sodeloval pri razvoju OA, saj so opazili povečan proces neoangiogeneze v hrustancu osteoartroznih bolnikov (69). Ker tudi subhondralna kost sodeluje pri patogenezi OA (2), bi lahko povečano izražanje VEGF-A v subhondralni kosti prispevalo k procesu kostne remodelacije preko povišanega izražanja RANKL, kar smo v naši študiji dokazali s pozitivno korelacijo med tema dvema genoma (slika 12). V kostnem tkivu, ki smo ga analizirali v naši študiji, se poleg kostnih celic nahajajo tudi celice kostnega mozga, ki prav tako izražajo VEGF-A.

Glede na povprečno izražanje genov za RANKL, VEGF-A in OPG, ki ga prikazuje slika 13, lahko opazimo, da je bilo izražanje OPG zelo povišano, izražanje RANKL in VEGF-A pa za več kot polovico manjše od OPG. Sklepamo lahko, da je OPG zavrl interakcijo RANKL-RANK in tako preprečil nadaljnjo diferenciacijo in aktivacijo osteoklastov. Lahko bi rekli, da je OPG opravil svojo protektivno vlogo in preprečil razgradnjo kosti. Če se opremo na rezultate iz objavljene študije Haynes s sod. (71), lahko trdimo, da so naši rezultati v skladu z njihovo ugotovitvijo, da je pri OA razmerje OPG/RANKL povečano, kar kaže na premik v smeri tvorjenja kosti.

5.4. POVEZANOST MED IZRAŽANJEM GENOV ZA TXNRD1 IN VEGF-A Z OPG

V študiji Lean s sod. so ugotovili, da pomanjkanje estrogenov povzroči pospešeno kostno resorpcijo tudi zaradi vpliva na zmanjšano izražanje tiolnih antioksidantov, kot je TXNRD1 v osteoklastih. Osteoklasti so tako bolj dovzetni za osteoklastne signale in pospešeno kostno resorpcijo. Pomanjkanje estrogenov stimulira resorpcijo kosti, saj vpliva na povečano izražanje genov za RANKL in zmanjšano izražanje OPG (72). V študiji Trošt s sod. so osteoblaste izpostavili vodikovemu peroksidu in jih tako podvrgli oksidativnemu stresu. Kot je bilo pričakovano, se je izražanje gena za OPG zmanjšalo, izražanje gena za RANKL pa povečalo in tako stimuliralo resorpcijo kosti. Od vseh preiskovanih antioksidativnih genov se je najbolj povečalo izražanje gena za AOX1, za kar 24-krat (24.5-krat, $p= 0.005$; 500 μM , 72 ur). Za gen TXNRD1 (3.0 do 3.7-krat, $p= 0.003-0.004$) pa so dokazali 4-krat višje izražanje. AOX1 in TXNRD1 sta tako pomembna antioksidativna encima, ki se pomembno odzoveta na stres (73). Predvideva se, da ekspresijo AOX sproži NO, ki nastane skupaj z ROS. AOX sodeluje pri mitohondrijskem elektronskem prenosu in tako poskuša odstraniti nastale ROS, ki negativno vplivajo na kosti (43).

V naši študiji smo dokazali mejno statistično značilno pozitivno povezavo med TXNRD1 in OPG, ki bi lahko bila posledica estrogenske regulacije v kostnem tkivu (72). Vendar pa je bilo v našo študijo vključenih premalo žensk preiskovank, da bi lahko zanesljivo preverili to povezavo. Kot so dokazali v študiji Trošt s sod., oksidativni stres stimulira izražanje RANKL in zmanjša izražanje OPG. Zaradi slednjega se OPG ne more vezati na RANKL in preprečiti interakcije RANKL-RANK. RANKL se tako veže na osteoklastni receptor RANK, kar sproži osteoklastogenezo in razgradnjo kosti. V prisotnosti oksidativnega stresa se povečano izraža tudi antioksidativni encim TXNRD1, ki zavre vodikov peroksid (37) in zmanjša vpliv ROS na kosti. Ob povečanem izražanju TXNRD1 bi se moralo povečati tudi izražanje OPG, da bi nato skupaj zavrla proces kostne resorpcije.

Kot vemo, VEGF-A inducira osteoklastogenezo preko povečanega izražanja RANKL (74). Ker so naši rezultati pokazali pozitivno povezavo med VEGF-A in OPG, bi lahko na podlagi tega predvidevali, da se izražanje OPG v osteoblastih poveča zaradi vpliva VEGF-A na povečano izražanje RANKL. OPG se veže na RANKL in zavre interakcijo z RANK.

Ko se izražanje VEGF-A zmanjša, se tudi OPG začne manj izražati. Naši rezultati so pokazali veliko višjo stopnjo izražanje OPG v primerjavi z VEGF-A in RANKL v subhondralni kostnini (slika 13). Na podlagi tega bi lahko trdili, da je OPG uspel preprečiti povezavo RANKL-RANK in s tem resorpcijo kosti.

5.5. POVEZANOST IZRAŽANJE MED SOD2, TXNRD1, CAT IN SEPP1 Z RANK

RANK se nahaja na osteoklastih. Ko se nanj veže RANKL, se preko znotrajcelične signalne poti sproži proces osteoklastogeneze in poveča aktivnost osteoklastov, kar vodi v pospešeno resorpcijo kosti (75).

Encim SOD2 odstranjuje proste kisikove radikale in v primeru povečanega izražanja pride do močno izraženega protektivnega delovanja (19,76). Eden iz-med razlogov za obsežno oksidativno poškodbo kostnih celic bi lahko bilo pomanjkanje ali neučinkovito delovanje antioksidativnih encimov, kot je npr. SOD2. Pomanjkanje SOD2 bi lahko bilo povezano s povečanjem metilacije promoterja v genu za SOD2, ki epigenetsko uravnava izražanje gena za SOD2 (26). Zaradi mitohondrijske disfunkcije se poveča produkcija ROS in zmanjša izražanje SOD2 v hrustancu in kosteh (26). Mehanska poškodba hrustanca lahko sproži povečano nastajanje ROS, ki aktivirajo apoptozo hondrocitov (26). Apoptozo hondrocitov preko okvare mitohondrijske DNA pa lahko sprožijo tudi vnetni citokini kot sta IL-1 β in TNF- α (26). V študiji Scott s sod. so odkrili, da pride do zmanjšane izražanja SOD2 že v začetni fazi razvoja OA. V končni fazi osteoartroznega hrustanca pa so opazili značilno kritično pomanjkanje encima SOD2, ki je bilo povezano z zvečano produkcijo ROS, ne pa tudi z zvečanim izražanjem encimov kolagenaz, ki razgrajujejo hrustančni matriks, kar nakazuje kompleksno vlogo oksidativnega stresa v patogenezi OA (31).

Naši rezultati so pokazali negativno povezavo med SOD2 in RANK. Ta povezava bi lahko pomenila, da zmanjšano izražanje SOD2, ki je lahko povezano z okvaro ali »izčrpanostjo« tega antioksidativnega encima, poveča aktivnost osteoklastov in s tem proces kostne resorpcije. Izražanje gena za RANK se v osteoklastih tako poveča. V primeru, ko ne gre za pomanjkanje antioksidativnega encima SOD2, se v prisotnosti oksidativnega stresa poveča izražanje tega gena. SOD2 odstrani proste radikale in prepreči povečano izražanje gena za RANK ter »zaščiti« kosti pred razgradnjo.

TXNRD1 reducira ROS, lahko pa ohranja tudi druge antioksidativne encime v aktivni reducirani obliki (34). Z uravnavanjem količine ROS bi lahko vplival na izražanje gena za RANKL, preko katerega se regulira izražanje gena za RANK. V naši študiji smo dokazali negativno povezavo med izražanjem TXNRD1 in RANK. Povezava med RANK in TXNRD1 je bila mejno statistično značilna ($p = 0.123$). Vpliv TXNRD1 na RANK je najverjetneje posredovan preko RANKL, vendar bi morali to dokazati tudi z *in vitro* študijami. Negativna povezava med RANK in TXNRD1, ki smo jo dokazali v naši študiji, pa bi lahko nakazovala podoben mehanizem kot pri SOD2. Torej manjše izražanje gena za TXNRD1 bi lahko bila posledica okvare ali »izčrpanosti« tega encima. To bi vodilo v povečano izražanje gena za RANK, ki stimulira osteoklastogenezo in resorpcijo kosti.

CAT igra pomembno vlogo pri pridobivanju tolerance do oksidativnega stresa v celici, saj ščiti celice pred H_2O_2 , ki nastaja v njih (29). Postmenopavzne ženske, ki so jih vključili v raziskavo Zhang s sod., so imele zmanjšano MKG. Ugotovili so, da je zmanjšana MKG povezana z višjo plazemsko lipidno oksidacijo, pri tem pa sta izražanje in aktivnost encima CAT zmanjšana (77). Ker je za nekatere oblike OA (L-OA) prav tako značilna subhondralna resorpcija kosti (20), smo rezultate iz navedene raziskave primerjali s svojimi. V študiji, kjer so raziskovali vpliv protiteles IgG proti CAT in SOD pri RA, so rezultati pokazali povišano raven protiteles IgG. Preiskovanci, ki so bili vključeni v to študijo, so imeli prisotno lipidno peroksidacijo. Avtoprotitelesa so tako zavrta aktivnost encimov CAT in SOD. Prosti radikali tako niso bili odstranjeni in so pri RA povzročil oksidativni stres, ki je negativno vplival na kosti (78).

Statistično značilno negativno povezavo med CAT in RANK, ki smo jo dobili v naši študiji, si lahko razlagamo tako: zmanjšano izražanje gena za CAT vpliva na večjo izpostavljenost kostnih celic oksidativnemu stresu. Zaradi slednjega se je lahko izražanje gena RANK v osteoklastih povečalo. Na ta način se je lahko povečala aktivnost osteoklastov v kostnini, kar vodi v razgradnjo kosti, kot so to tudi dokazali pri osteoporoznih ženskah v študiji Zhang s sod. (77). Avtoprotitelesa IgG proti encimu CAT, ki bi zavrta antioksidativno delovanje encima, bi lahko bila prisotna tudi v naših vzorcih, vendar bi to morali še dodatno določiti.

SEPP1 sodeluje v redoks-reakcijah, saj v prisotnosti glutationa zaščiti plazemsko membrano pred oksidativnim stresom (38). Ker SEPP1 zaščiti celice pred ROS, se

posledično zavre izražanje genov za RANKL in diferenciacija osteoklastov (41). V raziskavi Zeng s sod. so ugotovili, da je koncentracija selena, ki je potrebna za delovanje encima SEPP1, obratnosorazmerna z resorpcijo kostnine in pozitivno korelira z MKG (41). Ker encim SEPP1 v svoji strukturi vsebuje 50% celotnega plazemskega selena, je tudi njegovo izražanje odvisno od koncentracije selena v telesu (38,39) ter s tem tudi delovanje RANKL, RANK, ROS in MKG. Žal v naši preiskovani skupini ne razpolagamo s podatki o koncentraciji selena, bi bilo pa zelo zanimivo izmeriti koncentracijo selena pri preiskovancih z zgodnjo ali razvito obliko OA.

Naše dobljene rezultate pozitivne povezave med RANK in SEPP1 si lahko razlagamo tako: ko se poveča aktivnost gena za RANK, ki ga sprožijo ROS, pride do diferenciacije osteoklastov in njihove aktivacije, sledi razgradnja kostnega tkiva. ROS pa sprožijo tudi povečano izražanje gena za SEPP1, ki je lovilec peroksinitritov (38). SEPP1 pripomore k zmanjšanemu nastajanju ROS, posledično se zavre inducirano izražanje gena za RANKL in nadaljnja signalizacija za diferenciacijo osteoklastov preko gena za RANK (41).

Če primerjamo izražanje tistih genov, za katere smo potrdili statistično značilno korelacijo z RANK (slika 20), vidimo, da se je pri preiskovancih najbolj izražal gen encima SEPP1, sledi SOD2 in CAT. Izražanje genov za SOD2 in CAT je dokaj podobno, saj v prisotnosti oksidativnega stresa, encima med seboj tesno sodelujeta. SOD2 pretvori nastali superoksidni radikal v vodikov peroksid, ki ga nato encim CAT dalje pretvori v vodo in kisik (29). Ker je za encim SEPP1 znano, da je njegova aktivnost bistvena za vzdrževanje MKG in hrustanca, je verjetno zato izražanje SEPP1 najbolj povečano (41). SEPP1 tako najbolj učinkuje pri zmanjšanju neželenih učinkov oksidativnega stresa na kostnino (41). Kljub temu, da je bilo izražanje SOD2 in CAT zmanjšano, lahko predvidevamo, da so encimi SOD2, CAT in SEPP1 opravili antioksidativno vlogo in tako onemogočili RANK sprožiti resorpcijo kosti. To nakazuje tudi dejstvo, da smo te rezultate dobili na subhondralni kostnini starejših preiskovancev brez kostnih in sklepnih bolezni. Ti rezultati tako pomembno prispevajo k vedenju o delovanju antioksidativnih encimov na sistem RANK/RANKL/OPG v fizioloških pogojih kostne remodelacije in brez kliničnih znakov bolezni kosti ali hrustanca.

6. SKLEP

Glede na dobljene rezultate izražanja genov, našo raziskavo zaključujemo s sledečimi sklepi:

- izražanje gena za RANKL je v močni pozitivni povezavi z izražanjem gena za VEGF-A in OPG. Prav tako sta med seboj v močni pozitivni povezavi tudi gena OPG in VEGF-A. Te povezave kažejo na pomembno povezanost med procesom angiogeneze in kostno remodelacijo v subhondralni kosti. Ker so bile te povezave ugotovljene pri starejših preiskovancih brez kliničnih znakov kostnih bolezni, bi lahko nakazovale s starostjo povezane degenerativne spremembe v subhondralni kosti, ki se pojavijo veliko prej kot klinično izražene spremembe na hrustancu,
- izražanje gena za RANK je v srednje močni negativni povezavi s CAT in SOD2. Ta ugotovitev potrjuje predhodne *in vitro* študije, kjer so dokazali, da igrajo antioksidativni encimi pomembno vlogo pri aktivnosti osteoklastov. Povečan oksidativni stres povzroči povečano izražanje SOD2 in CAT v osteoklastih, ki posledično zavreta aktivnost osteoklastov. Njuno izražanje v kostnini je podobno, saj encima v prisotnosti oksidativnega stresa med seboj tesno sodelujeta,
- izražanje genov za RANK in SEPP1 je v močni pozitivni povezavi, kar nakazuje ravno nasproten učinek SEPP1 na osteoklaste, kot ga imata SOD2 in CAT,
- izražanje encima TXNRD1 je bilo mejno statistično značilno povezano z OPG in RANK, kar nakazuje, da bi TXNRD1 lahko deloval preko osi RANK, RANKL, OPG, vendar bi morali to trditev preizkusiti na večji skupini preiskovancev, predvsem pa mehanizem delovanja potrditi *in vitro* na celični liniji osteoklastov.

Naše raziskovalno delo lahko zaključimo:

Najpomembnejšo vlogo v subhondralni kosti pri starejših preiskovancih brez kliničnih znakov bolezni hrustanca ima OPG, ki regulira os RANKL/RANK. Kot najpomembnejši

antioksidativni encim, ki vpliva na os RANK/RANKL/OPG, se je v naši raziskavi izkazal SEPP1. Zaradi zvišanega izražanja OPG sta osteoklastogeneza in posledično kostna razgradnja v večji meri zavrti, kar se kaže v večji kostni masi subhondralne kostnine. To pa je ena od značilnosti osteoartroze. Poleg glavne signalne poti RANK/RANKL/OPG pa igra pomembno vlogo v SB tudi angiogeneza in njen glavni predstavnik VEGF-A. Ta bi lahko vplival na regulacijo subhondralne kosti prav tako preko RANK, RANKL, OPG tudi pri starejših preiskovancih brez klinično izraženih kostnih bolezni.

7. LITERATURA

1. Slovenski medicinski e-slovar. <http://www.lek.si/si/skrb-za-zdravje/medicinski-slovar/> (Julij 2013).
2. Burr D.B : The Importance of Subchondral Bone in the Progression of Osteoarthritis. *J Rheumatol* 2004; 70: 77-80.
3. Clarke B: Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3: 131-139.
4. Pal M, Krajnc I, Potočnik U: Osteoarthritis: patogeneza in farmakološko zdravljenje. *Med Mes* 2008; 4:88-93.
5. Hui A.Y, McCarty W.J, Masuda K, Firestein G.S, Sah R.L: A Systems Biology Approach to Synovial Joint Lubrication in Health, Injury, and Disease. *Wiley Interdiscp Rev Syst Biol Med* 2012; 4(1): 15-37.
6. Osteoarthritis. <http://umm.edu/health/medical/reports/articles/osteoarthritis> (September 2013).
7. Marš T: Motnje v presnovi kalcija in fosfatov. Seminarji iz patološke fiziologije. 1.izdaja, Ljubljana: Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, 2008; 85-90.
8. Lories R.J, Luyten F.P: The bone-cartilage unit in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2011; 7: 43–49.
9. Pal M, Krajnc I: Osteoimunologija: RANKL/RANK/OPG citokinski sistem. *Med Mes* 2008; 4:94-97.
10. Caetano-Lopes J, Canhao H, Fonseca J.E: Osteoblasts and bone formation. *Acta Reum Port* 2007; 32:103-110.
11. Boyce B. F, Yao Z, Xing L: Osteoclasts have Multiple Roles in Bone in Addition to Bone Resorption. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2009; 19(3): 171-180.
12. Eijken M: Human Osteoblasts Differentiation and Bone Formation: Growth Factors, Hormones and Regulatory Networks. Haveka BV, Alblasterdam, The Netherlands, 2007; 13-15.
13. Bregar M: Novejša spoznanja na področju etiopatogeneze in zdravljenja primarne osteoartroze. *Zdrav vestn* 2002; 71: 235-9.

14. Mahjoub M, Berenbaum F, Houard X: Why subchondral bone in osteoarthritis? The importance of the cartilage bone interface in osteoarthritis. *Osteoporos Int* 2012; 23 (8): 841-846.
15. Prirejeno po: Basic Arthritis Research.
<http://www.med.nyu.edu/medicine/labs/abramsonlab/basic-arth-research.html>
(Oktober 2013).
16. Burr D. B, Gallant M. A: Bone remodeling in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2012; 8(11): 665-73.
17. Mansell J.P, Collins C, Bailey A.J: Bone, not cartilage, should be the major focus in osteoarthritis. *Nat Clin Pract Rheum* 2007; 3: 306-307.
18. Roman-Blas J.A, Herrero-Beaumont G: Osteoarthritis pathophysiology: similarities and dissimilarities with other rheumatological diseases and the role of subchondral bone. *Medicographia* 2013; 35: 158-163.
19. Matés J.M, Pérez-Gómez C, De Castro I.N: Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clinical Biochemistry* 1999; 32: 595-603.
20. Kwan Tat S, Pelletier J. P, Velasco C. R, Padrines M, Pelletier J. M: New Perspective in Osteoarthritis: The OPG and RANKL System as a Potential Therapeutic Target?. *Keio J Med* 2009; 58(1): 29-40.
21. Murata M, Yudoh K, Masuko K: The potential role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage: How the angiogenic factor could be involved in the pathogenesis of osteoarthritis?. *Osteoarthritis and Cartilage* 2008; 16: 279-286.
22. Nakagawa M, Kaneda T, Arakawa T, Morita S, Sato T, Yomada T, Hanada K, Kumegawa M, Hakeda Y: Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts. *FEBS Letters* 2000; 473(2): 161-164.
23. Haywood L, McWilliams D.F, Pearson C.I, Gill S.E, Ganesan A, Wilson D, Walsh D.A: Inflammation and Angiogenesis in Osteoarthritis. *ARTHRITIS & RHEUMATISM* 2003; 48(8): 2173–2177.
24. Osredkar J: Oksidativni stres. *Zdrav Vestn* 2012; 81: 393-406.
25. Ziskoven C, Jäger M, Zilkens C, Bloch W, Brixius K, Krauspe R: Oxidative stress in secondary osteoarthritis: from cartilage destruction to clinical presentation?. *Orthop Rev (Pavia)* 2010; 2: 95-101.
26. Loeser R.F: Aging and Osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2011; 23(5): 492-496.

27. Henrotin Y, Kurz B, Aigner T: Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes?. *OsteoArthritis and Cartilage* 2005; 13: 643-654.
28. Khansari N, Shakiba Y, Mahmoudi M: Chronic Inflammation and Oxidative Stress as a Major Cause of Age-Related Diseases and Cancer. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery* 2009; 3: 73-80.
29. Matés J.M, Pérez-Gómez C, De Castro I.N: Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clinical Biochemistry* 1999; 32: 595-603.
30. Rejc B, Osredkar J, Geršak K: Oksidacijski stres in nosečnost. *Farm vest* 2012; 63: 153-161.
31. Scott J.L, Gabrielides C, Davidson R.K, Swingler T.E, Clark I.M, Wallis G.A, Boot-Handford R.P, Kirkwood T.B.L, Taylor R.W, Young D.A: Superoxide dismutase downregulation in osteoarthritis progression and end-stage disease. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 1502-1510.
32. El-Soheily A, Comelis M.C, Park Y.W, Bae S.C: Catalase and PPAR γ 2 genotype and risk of rheumatoid arthritis in Koreans. *Rheumatology International* 2006; 26(5): 388-392.
33. Mohan Surapaneni K, Venkataramana G: Status of lipid peroxidation, glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant enzymes in patients with osteoarthritis. *Indian Journal of Medical Sciences* 2007; 61(1): 9-14.
34. Arnér E.S.J, Holmgren A: Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 2000; 267: 6102-6109.
35. Suvorova E.S, Lucas O, Weisend C.M, Rollins M.F, Merrill G.F, Capecchi M.R, Schmidt E.E: Cytoprotective Nrf2 Pathway Is Included In Chronically Txnrd 1-Deficient Hepatocytes. *PLoS ONE* 2009; 4: 1-12.
36. Becker K, Gromer S, Schirmer R.H, Müller S: Thioredoxin reductase as a pathophysiological factor and drug target. *European Journal of Biochemistry* 2000; 267(20): 6118-6125.
37. Kabuyama Y, Kitamura T, Yamaki J, Homma M.K, Kikuchi S, Homma Y: Involvement of thioredoxin reductase 1 in the regulation of redox balance and viability of rheumatoid synovial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008; 367(2): 491-496.

38. Burk R.F, Hill K.E: Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. *Annu Rev Nutr* 2005; 25: 215-235.
39. Saito Y, Takahashi K: Selenoprotein P: Its Structure and Functions. *Journal of Health Science* 2000; 46(6): 409-413.
40. SEPP1 (selenoprotein P, plasma,1).
<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/SEPP1ID46513ch5p12.html> (August 2013).
41. Zeng H, Cao J.J, Combs G.F: Selenium in Bone Health: Roles in Antioxidant Protection and Cell Proliferation. *Nutrients* 2013; 5(1): 97-110.
42. Pryde D.C, Dalvie D, Hu Q, Jones P, Obach R.S, Tran T.D: Aldehyde Oxidase: An Enzyme of Emerging Importance in Drug Discovery. *J Med Chem* 2010; 53: 8441-8460.
43. Gupta K.J, Igamberdiev A.U, Mur L.A: NO and ROS homeostasis in mitochondria: a central role for alternative oxidase. *New Phytologist* 2012; 195: 1-3.
44. PRDX5 peroxiredoxin 5 [Homo sapiens (human)].
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=25824> (August 2013).
45. Goo Rhee S, Wong Kang S, Chang T.S, Jeong W, Kanghwa K: Peroxiredoxin, a Novel Family of Peroxidases. *IUBMB Life* 2001; 52: 35-41.
46. Wang M.X, Wei A, Yuan J, Trickett A, Knoop B, Murrell G.A.C: Expression and regulation of peroxiredoxin 5 in human osteoarthritis. *FEBS Letters* 2002; 2: 359-362.
47. Funke S, Risch A, Nieters A, Hoffmeister M, Stegmaier C, Seiler C.M, Brenner H, Chang-Claude J: Genetic Polymorphisms in Genes Related to Oxidative Stress (GSTP1, GSTM1, GSTT1, CAT, MnSOD, MPO, eNOS) and Survival of Rectal Cancer Patients after Radiotherapy. *Journal of Cancer Epidemiology* 2009; 1-6.
48. Transcription profiling of human rheumatoid arthritis patients derived synovial fibroblasts - using boolean network models for extracellular matrix formation.
<http://www.ebi.ac.uk/gxa/experiment/E-GEOD-13837/ENSG00000084207>
(November 2013).

49. Morinobu S, Morinobu A, Kanagawa S, Hayashi N, Nishimura K, Kumagai S: Glutathione S-transferase gene polymorphisms in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology* 2006; 24: 268-273.
50. Wollbold J, Huber R, Pohlers D, Koczan D, Guthke R, Kinne R.W, Gausmann U: Adapted Boolean network models for extracellular matrix formation. *BMC Syst Biol* 2009; 77(3): 1-37.
51. Del Carlo M, Loeser R.F: Increased Oxidative Stress With Aging Reduces Chondrocyte Survival. *ARTHRITIS & RHEUMATISM* 2003; 48(12): 3419-3430.
52. QIAGEN: RNeasy® Lipid Tissue Handbook. *Sample & Assay Technologies* 2009; 2: 4-38.
53. Ireland D: Analysis of Gene Expression in Bone by Quantitative RT-PCR. *Methods in Molecular Medicine* 2003; 80: 433-440.
54. Štrukelj B, Kos J: *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 55-58.
55. QIAGEN: Critical Factors for successful Real-Time PCR. *Real-Time PCR Brochure* 2010; 7: 4-63. Dostopno na: <http://www.qiagen.com/knowledge-and-support/resource-center/resource-search/>.
56. SYBR® Green PCR Master Mix and SYBR® Green RT-PCR Reagents Kit. http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041053.pdf (Oktober 2013).
57. Arko B: Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. *Farm Vestn* 2004; 55: 215-220.
58. Real-Time PCR: FROM THEORY TO PRACTICE. <http://corelabs.cgrb.oregonstate.edu/sites/default/files/Real%20Time%20PCR.From%20Theory%20to%20Practice.pdf> (Oktober 2013).
59. Uracil-DNA glycosylase. <http://www.pcrbio.com/realtime-pcr/uracil-dna-glycosylase-en.html> (Oktober 2013).
60. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT: The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 2009; 55:4: 611-622.
61. Adamič Š: *Temelji biostatistike*, 2. izdaja, Medicinska fakulteta, Ljubljana, 1989: 45-119.

62. Košmelj K: Uporabna statistika. 2.dopolnjena izdaja, Ljubljana: Biotehniška fakulteta, 2007; 161-171.
Dostopno na:
[http://www.bf.unilj.si/fileadmin/groups/2721/Uporabna statistika okt 2007/Uporabna statistika 01.pdf](http://www.bf.unilj.si/fileadmin/groups/2721/Uporabna_statistika_okt_2007/Uporabna_statistika_01.pdf).
63. Primer BLAST. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (Julij 2013).
64. National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Julij 2013).
65. Ye J, Coulouris G, Madden T.L: Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics 2012; 13: 134-153.
66. Oligo Analyzer.
<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/default.aspx> (Julij 2013).
67. Lindbjerg Andersen C, Jensen J.L, Ørntof T.F: Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. Cancer Research 2004; 64: 5245–5250.
68. Zupan J, Komadina R, Marc J: The relationship between osteoclastogenic and anti-osteoclastogenic pro-inflammatory cytokines differs in human osteoporotic and osteoarthritic bone tissues. Journal of Biomedical Science 2012; 19: 28-38.
69. Pufe T, Lemke A, Kurz B, Petersen W, Tillmann B, Grodzinsky A.J, Mentlein R: Mechanical Overload Induces VEGF in Cartilage Discs via Hypoxia-Inducible Factor. The American Journal of Pathology 2004; 164(1): 185-192.
70. Geusens P.P, Landewe R.B.M, Garnero P, Chen D, Dunstan C.R, Lems W.F, Van der Heijde D.M.F.M, Van der Linden S, Boers M: The ratio of circulating osteoprotegerin to RANKL in early rheumatoid arthritis predicts later joint destruction. Arthritis & Rheumatism 2006; 54(6): 1772-1777.
71. Haynes D.R, Barg E, Crotti T.N, Holding C, Weedon H, Atkins G.J, Zannettino A, Ahern M.J, Coleman M, Roberts-Thomson P.J, Kraan M, Tak P.P, Smith M.D: Osteoprotegerin expression in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, spondyloarthropathies and osteoarthritis and normal controls. Rheumatology 2003; 42: 123-134.

72. Lean J.M, Davies J.T, Fuller K, Jagger C.J, Kristein B, Partington G.A, Urry Z.L, Chambers T.J: A crucial role for thiol antioxidants in estrogen-deficiency bone loss. *J Clin Invest* 2003; 112(6): 915-923.
73. Trošt Z, Trebše R, Preželj J, Komadina R, Bitenc Logar D, Marc J: A microarray based identification of osteoporosis-related genes in primary culture of human osteoblasts. *Bone* 2009; 1-9.
74. Niida S, Kaku M, Amano H, Yoshida H, Kataoka H, Nishikawa S, Tanne K, Maeda N, Nishikawa S, Kodam H: Vascular Endothelial Growth Factor Can Substitute for Macrophage Colony-Stimulating Factor in the Support of Osteoclastic Bone Resorption. *JEM* 1999; 190(2): 293-298.
75. Mosheimer B.A, Kaneider N.C, Feistritz C, Sturn D.H, Wiedermann C.J: Expression and function of RANK in human monocyte chemotaxis. *Arthritis & Rheumatism* 2004; 50(7): 2309-2316.
76. Pečar S, Perdih A: Katalitični antioksidanti kot nove zdravilne učinkovine. *Farm vestn* 2006; 57: 24-29.
77. Zhang J.K, Yang L, Meng G.L, Yuan Z, Fan J, Li D, Chen J.Z, Shi T.Y, Hu H.M, Wei B.Y, Luo Z.J: Protection by Salidroside against Bone Loss via Inhibition of Oxidative Stress and Bone-Resorbing Mediators. *PLOS ONE* 2013; 8(2): 1-10.
78. Mansour R.B, Lassoued S, Gargouri B, Gaid A.El, Attia H, Fakhfakh F: Increased levels of autoantibodies against catalase and superoxide dismutase associated with oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 2008; 37(2): 103-108.

8. PRILOGE

Preglednica: Izmerjene vrednosti izražanja genov v vzorcih.

| vzorec SB | SOD2 | TXNRD1 | CAT | SEPP1 | AOX1 | PRDX5 | GSTP1 | VEGFA | RANK | RANKL | OPG |
|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| SB21 | 1,0360 | 1,0683 | 0,7828 | 2,3678 | 1,9039 | 0,7287 | 1,6450 | 1,1388 | 2,4977 | 1,6137 | 9,5756 |
| SB22 | 0,9293 | 1,7520 | 3,2042 | 2,4611 | 0,7089 | 0,8302 | 0,7646 | 9,1925 | 0,8225 | 4,4989 | 7,6851 |
| SB25 | 0,3541 | 0,8113 | 0,4656 | 3,7154 | 1,0234 | 0,6948 | 1,0600 | 2,8733 | 3,0529 | 2,1210 | 5,8831 |
| SB26 | 0,5451 | 0,9031 | 0,6261 | 4,2024 | 1,2349 | 0,7494 | 2,0345 | 1,8178 | 6,3555 | 1,4826 | 4,8840 |
| SB27 | 0,8497 | 1,6731 | 2,8248 | 3,1238 | 0,8736 | 1,0444 | 0,7869 | 2,2942 | 1,1431 | 1,2696 | 3,5991 |
| SB28 | 3,5365 | 0,7269 | 0,9906 | 0,4413 | 0,4213 | 0,3694 | 0,3462 | 1,1460 | 0,1106 | 0,5692 | 0,0915 |
| SB30 | 2,5218 | 2,2765 | 2,9631 | 2,0042 | 1,1417 | 1,1822 | 2,0481 | 9,8018 | 0,1818 | 8,3921 | 42,7824 |
| SB32 | 1,8835 | 1,5063 | 2,9732 | 3,6021 | 0,8860 | 0,7814 | 0,7203 | 1,6300 | 0,7592 | 1,5080 | 8,2399 |
| SB33 | 1,6285 | 1,9730 | 5,1730 | 1,8619 | 0,6386 | 1,3389 | 0,8340 | 1,2527 | 0,6424 | 0,3581 | 1,4547 |
| SB34 | 1,0659 | 1,5327 | 2,4276 | 3,9562 | 1,0776 | 0,9270 | 0,9795 | 1,5782 | 2,0101 | 0,7209 | 9,7660 |
| SB35 | 0,9011 | 0,7550 | 0,5670 | 4,9642 | 0,8509 | 0,5243 | 1,1073 | 1,3068 | 4,5167 | 1,6155 | 2,8380 |
| SB37 | 0,8802 | 0,8251 | 0,6239 | 4,7531 | 0,8840 | 0,5668 | 2,1267 | 1,7691 | 4,7603 | 3,0822 | 4,9797 |
| SB40 | 0,6967 | 1,5414 | 2,1360 | 1,4329 | 1,4927 | 1,1397 | 0,9337 | 0,6379 | 1,6257 | 0,1327 | 1,0937 |
| SB42 | 0,5111 | 1,0744 | 0,7852 | 4,4874 | 0,2955 | 0,6517 | 0,9510 | 0,8674 | 7,8174 | 0,8026 | 1,4654 |
| SB36 | 0,8419 | 1,1391 | 0,6443 | 3,1921 | 0,6299 | 0,6120 | 0,9363 | 1,5479 | 1,8089 | 3,4928 | 5,0854 |
| SB44 | 0,5150 | 0,9687 | 0,8917 | 3,0103 | 0,9654 | 0,9572 | 1,8877 | 3,5027 | 1,4040 | 3,8115 | 8,4784 |
| SB45 | 0,4081 | 0,6280 | 0,6072 | 4,5838 | 1,0586 | 0,5755 | 0,8327 | 3,3008 | 3,6334 | 2,5086 | 7,5164 |
| SB48 | 0,6436 | 1,1623 | 1,8238 | 2,0526 | 0,3490 | 0,5820 | 0,5499 | 0,7000 | 3,1489 | 0,6223 | 1,7420 |

Preglednica: Korelacije med geni v SB.

| | | SOD2 | TXNRD1 | CAT | SEPP1 | AOX1 | PRDX5 | GSTP1 | VEGFA | RANK | RANKL | OPG |
|--------|---|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|
| SOD2 | p | | ,171 | ,111 | ,009 | ,445 | ,916 | ,367 | ,389 | ,010 | ,422 | ,159 |
| | N | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 |
| | r | ,310 | 1 | ,878** | -,362 | -,047 | ,796** | -,049 | ,495* | -,494* | ,347 | ,504* |
| TXNRD1 | p | ,020 | ,171 | ,000 | ,106 | ,841 | ,000 | ,832 | ,023 | ,023 | ,123 | ,020 |
| | N | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 |
| | r | ,358 | ,878** | 1 | -,432 | -,181 | ,711** | ,304 | ,308 | - | ,072 | ,201 |
| | | | | | | | | | | ,565** | | |
| CAT | P | ,111 | ,000 | | ,051 | ,433 | ,000 | ,180 | ,175 | ,008 | ,758 | ,382 |
| | N | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 |
| | r | - | ,362 | -,432 | 1 | ,075 | ,201 | ,416 | -,146 | ,808** | -,089 | -,054 |
| | | | | | | | | | | ,554** | | |
| SEPP1 | p | ,009 | ,106 | ,051 | | ,745 | ,382 | ,061 | ,537 | ,000 | ,700 | ,817 |
| | N | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 |
| | r | -,176 | -,047 | -,181 | ,075 | 1 | ,321 | ,544* | -,017 | -,024 | ,025 | ,168 |
| AOX1 | p | ,445 | ,841 | ,433 | ,745 | | ,156 | ,011 | ,940 | ,916 | ,914 | ,469 |
| | N | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 |
| | r | ,024 | ,796** | ,711** | -,201 | ,321 | 1 | ,235 | ,271 | -,344 | ,158 | ,327 |
| PRDX5 | p | ,916 | ,000 | 0,00 | ,382 | ,156 | | ,306 | ,235 | ,126 | ,494 | ,148 |
| | N | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 |
| | r | -,208 | -,049 | ,304 | ,416 | ,544* | ,235 | ,195 | ,195 | ,259 | ,409 | ,425 |
| GSTP1 | p | ,367 | ,832 | ,180 | ,061 | ,011 | ,306 | | ,397 | ,110 | ,065 | ,055 |
| | N | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 |
| | r | ,198 | ,495* | ,308 | -,146 | -,017 | ,271 | ,195 | 1 | -,321 | ,867** | ,743** |
| VEGFA | P | ,389 | ,023 | ,175 | ,527 | ,940 | ,235 | ,397 | | ,157 | ,000 | ,000 |
| | N | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 |
| | r | -,548* | -,494* | - | ,808** | -,024 | -,343 | ,359 | -,321 | 1 | -,286 | -,216 |
| | | | | | | | | | | ,565** | | |
| RANK | P | ,010 | ,023 | ,008 | ,000 | ,916 | ,126 | ,110 | ,157 | | ,208 | ,348 |
| | N | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 |
| | r | ,185 | ,347 | ,072 | -,089 | ,025 | ,158 | ,409 | ,867** | -,286 | 1 | ,833** |
| RANKL | P | ,422 | ,123 | ,758 | ,700 | ,914 | ,494 | ,065 | ,000 | ,208 | | ,000 |
| | N | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 |
| | r | ,319 | ,504* | ,201 | -,054 | ,168 | ,327 | ,425 | ,743** | -,216 | ,833** | 1 |
| OPG | P | ,159 | ,020 | ,382 | ,817 | ,467 | ,148 | ,055 | ,000 | ,348 | ,000 | |
| | N | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 |
| | r | ,943** | ,453* | ,496* | -,541* | -,078 | ,155 | -,163 | ,186 | - | ,181 | ,316 |
| | | | | | | | | | | ,599** | | |

(N= število preiskovancev, r= Pearsonov koeficient korelacije, p= stopnja značilnosti, *= statistično značilna korelacija (*p < 0.05, **p < 0.01))